



Impact hémodynamique, suivi des volumes pulmonaires et inflammation en lien avec la ventilation liquidienne totale chez l'agneau nouveau-né

Par
Michaël Sage, M.Sc
Programme de physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor (PhD)*
en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Août 2020

Membres du jury d'évaluation de thèse :
Pr Philippe Juvet, département de pédiatrie, faculté de médecine,
Université de Montréal
Pr Frédéric Dallaire, département de pédiatrie
Pr Étienne Fortin-Pellerin, départements de pédiatrie et pharmacologie-physiologie
Pr Jean-Paul Praud, départements de pédiatrie et pharmacologie-physiologie
Pr Philippe Micheau, département de génie mécanique
Pr Ahmed Chraïbi, directeur du programme de physiologie, département de
pharmacologie-physiologie

SOMMAIRE

Introduction : La prise en charge respiratoire des patients nés extrêmement prématurés peut créer des dommages pulmonaires induits par la ventilation mécanique (VILI, *Ventilator-Induced Lung Injury*). Ces dommages contribuent au développement pathologique des poumons et à l'apparition de la maladie pulmonaire chronique du nouveau-né, aussi appelée dysplasie bronchopulmonaire (DBP). La ventilation liquidienne totale (VLT), qui a montré des avantages prometteurs dans la prise en charge d'une détresse respiratoire, pourrait prévenir le développement de la DBP en diminuant le VILI. Cependant, plusieurs zones d'ombre persistent avant de pouvoir considérer son utilisation chez des modèles d'extrêmes prématurés.

Projet 1 : Les données de la littérature sur la tolérance hémodynamique du nouveau-né soumis à une VLT varient selon le dispositif et l'algorithme de ventilation utilisés. L'impact du perfluorocarbène dense dans les poumons sur le remplissage ventriculaire a été très peu abordé dans la littérature. Avec le développement d'une technologie de VLT permettant de contrôler avec précision les volumes pulmonaires, une nouvelle étude s'imposait. Ainsi, dans un article publié dans *PLOS-one* (PMID 29377922), il a été montré que, chez un modèle d'agneau nouveau-né à terme avec déficit induit en surfactant, la VLT était bien tolérée et n'avait que des effets négligeables sur la fonction cardiaque, principalement lors de la phase d'inspiration.

Projet 2 : Chez ces mêmes agneaux, un deuxième projet qui visait à évaluer la distribution du perfluorocarbène dans les poumons durant la transition de la ventilation gazeuse (VG) à la VLT a été mis en place. Il a été démontré, dans un article publié dans *Frontiers in Physiology* (PMID 30555353), que l'air est principalement évacué dans les dix premières minutes de ventilation. De plus, il a été montré que le volume courant (V_T) était distribué de façon plus homogène qu'en VG, suggérant un meilleur rapport ventilation/perfusion.

Projet 3 : Finalement, les modalités optimales de VLT en termes de V_T , de fréquence respiratoire (FR) et leurs conséquences sur l'inflammation pulmonaire demeuraient, à ce jour, inconnues. De plus, très peu d'essais de retour en respiration spontanée après une VLT ont été décrits dans la littérature chez le modèle animal néonatal. Un projet chez l'agneau à terme sain a donc été mis en place afin de comparer l'influence des grands V_T (20 ml/kg) avec celle des petits V_T (10 ml/kg) sur l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et sur le retour en respiration spontanée. L'article a été publié dans *Frontiers in Physiology* (PMID 32625110). Il a ainsi été montré que l'utilisation de la VLT avec des V_T plus élevés associés à des FR plus faibles avait un profil inflammatoire pulmonaire favorable en comparaison avec des V_T plus faibles et des FR élevées. Aucune différence n'a été décelée dans les étapes du sevrage post-VLT. Le projet a aussi mis en évidence la possibilité de ramener en respiration spontanée les agneaux en moins de 4h suivant la VLT.

Conclusion : Les résultats obtenus durant ces travaux de thèse ont grandement contribué à améliorer les connaissances en physiologie de la VLT chez l'agneau à terme, ce qui permet maintenant d'envisager des études chez des agneaux extrêmement prématurés et ultimement chez les extrêmes prématurés humains.

Mots clés : Dysplasie bronchopulmonaire, ventilation liquidienne totale, déficit en surfactant, hémodynamie, volumes pulmonaires et inflammation pulmonaire.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS.....	1
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	3
1.1 Dysplasie bronchopulmonaire.....	4
1.1.1 Définition.....	4
1.1.2 Conséquences à long terme	4
1.2 Physiopathologie de la dysplasie bronchopulmonaire	6
1.2.1 Développement pulmonaire	6
1.2.2 Maladie des membranes hyalines.....	8
1.2.2.1 Surfactant pulmonaire.....	9
1.2.2.2 Déficit en surfactant.....	9
1.2.3 Dommages induits par l'oxygène et la ventilation mécanique.....	12
1.2.3.1 Oxygène.....	12
1.2.3.2 Ventilation mécanique	15
1.2.4 Autres mécanismes impliqués dans la pathogénie de la dysplasie bronchopulmonaire.....	16
1.2.4.1 Retard de croissance intra-utérin	16
1.2.4.2 Nutrition.....	16
1.2.4.3 Prédisposition génétique.....	17
1.2.4.4 Causes moins connues	18
1.3 Traitements actuels de la maladie des membranes hyalines	18

1.3.1 Ventilation non invasive.....	18
1.3.1.1 Pression positive continue nasale	19
1.3.1.2 Pression positive intermittente nasale.....	19
1.3.1.3 Lunettes nasales à haut débit	20
1.3.2 Ventilation mécanique invasive	20
1.3.2.1 Ventilation en mode pression contrôlée	21
1.3.2.2 Ventilation en mode volume garanti.....	21
1.3.2.3 Ventilation par oscillations à haute fréquence.....	22
1.3.2.4 Hypercapnie permissive.....	22
1.3.3 Surfactants exogènes	23
1.3.4 Caféine.....	23
1.3.5 Corticostéroïdes.....	24
1.3.6 Cible de saturation artérielle.....	25
1.4 Traitement à long terme de la dysplasie bronchopulmonaire	25
1.5 Nouvelles thérapies pour prévenir la dysplasie bronchopulmonaire	26
1.6 Résumé.....	27
CHAPITRE 2. VENTILATION LIQUIDIENNE	28
2.1 Ventilation liquidienne partielle.....	28
2.2 Ventilation liquidienne totale.....	29
2.3 Famille des perfluorocarbones	30
2.3.1 Caractéristiques des différents perfluorocarbones.....	30
2.3.2 Propriétés biochimiques du PFOB	31
2.4 Applications de la ventilation liquidienne	31
2.4.1 Traitement du syndrome de détresse respiratoire aiguë	32
2.4.2 Induction ultrarapide d'hypothermie thérapeutique	33

2.4.3 Lavage pulmonaire thérapeutique	34
2.4.4 Administration de médicaments	34
2.4.5 Croissance et développement pulmonaire	35
2.4.6 Cytoprotection	36
2.5 Prévention de la dysplasie bronchopulmonaire	36
2.6 Résumé	39
CHAPITRE 3. INOLIVENT	40
3.1 INOLIVENT-6	40
3.1.1 Description du prototype	40
3.1.2 Réglage des paramètres ventilatoires	41
3.1.3 Collapsus expiratoire en VLT	42
3.1.4 Algorithme de gestion des collapsus expiratoires.	43
3.1.5 Résumé	44
CHAPITRE 4. CONTEXTE DU PROGRAMME DOCTORAL	45
4.1 Impact de la ventilation liquidienne totale sur le retour veineux et les paramètres hémodynamiques.	45
4.1.1 Hypothèse principale	48
4.1.2 Hypothèse secondaire	48
4.1.3 Objectif principal	48
4.1.4 Objectif secondaire	48
4.2 Distribution du bromure de perfluorooctyle durant la ventilation liquidienne totale	49
4.2.1 Hypothèse principale	50
4.2.2 Hypothèse secondaire	50
4.2.3 Objectif principal	50
4.2.4 Objectif secondaire	50

4.3 Effet du V_T sur l'inflammation en ventilation liquidienne totale.....	51
4.3.1 Hypothèse principale.....	53
4.3.2 Hypothèse secondaire.....	53
4.3.3 Objectif principal.....	53
4.3.4 Objectif secondaire.....	53
CHAPITRE 5. RÉSULTATS OBTENUS.....	54
Article 1: Assessing the impacts of total liquid ventilation on left ventricular diastolic function in a model of neonatal respiratory distress syndrome	54
5.1.1 Avant-propos	54
5.1.2 Résumé	55
5.1.3 Article 1	56
Article 2: Perflubron distribution during transition from gas to liquid ventilation.....	74
5.2.1 Avant-propos	74
5.2.2 Résumé	75
5.2.3 Article 2	76
Article 3: Effect of low versus high tidal-volume total liquid ventilation on pulmonary inflammation	107
5.3.1 Avant-propos	107
5.3.2 Résumé	108
5.3.3 Article 3	109
CHAPITRE 6. DISCUSSION	136
6.1 Choix du modèle ovin néonatal :	136
6.1.1 Agneau nouveau-né.....	136
6.1.2 Modèle ovin de déficit induit en surfactant.....	137
6.2 Discussion de l'article 1	138
6.2.1 Effet hémodynamique de la VLT	139

6.2.2 Effet de l'inspiration sur les paramètres hémodynamiques.....	141
6.2.3 La VLT comme support respiratoire	143
6.2.4 Limites de l'étude	144
6.2.5 Conclusion.....	145
6.3 Discussion de l'article 2	146
6.3.1 Distribution du PFOB lors du remplissage initial en VLT	147
6.3.2 Évolution du volume de PFOB entre 10 et 120 minutes de VLT	149
6.3.3 Évaluation de la distribution du V_T en VLT.....	150
6.3.4 Évaluation de la perfusion pulmonaire.....	150
6.3.5 Limites de l'étude	151
6.3.6 Conclusion.....	152
6.4 Discussion de l'article 3	153
6.4.1 Inflammation en lien avec les modalités de VLT.....	154
6.4.1.1 IL1B, IL6 et TNF- α	154
6.4.1.2 Études exploratoires des profils d'expression	155
6.4.1.3 Score histologique	157
6.4.2 Ventilation minute et inflammation ?.....	158
6.4.3 Retour en respiration spontanée post-VLT.....	160
6.4.4 Limites de l'étude	160
6.4.5 Conclusion.....	162
CHAPITRE 7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	163
RÉFÉRENCES	166
ANNEXE 1.....	197
ANNEXE 2.....	198

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des deux PFC ayant une certification « qualité médicale »	31
Tableau supplémentaire 1. Séquences d'ADN des amorces utilisées pour les dosages des ARNm par RT-qPCR dans l'article 3	197

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Développement des voies aériennes et des artères pulmonaires	7
Figure 2. Stades de développement pulmonaire, facteurs potentiellement dommageables et types de dommages pulmonaires associés	8
Figure 3. Dommage alvéolaire et membranes hyalines	10
Figure 4. Radiographie d'un enfant né à 26 semaines d'âge gestationnel atteint de MMH 11	
Figure 5. Évolution des prototypes INOLIVENT.	40
Figure 6. Schéma du ventilateur liquidien INOLIVENT-6.	41
Figure 7. Signal de pression mesurée au connecteur en Y lors d'une VLT.	43

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACP	Analyse en composantes principales
AG	Âge gestationnel
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CRF	Capacité résiduelle fonctionnelle
DBP	Dysplasie bronchopulmonaire
dP/dt	Dérivée première de la pression du ventricule gauche par rapport au temps
FiO ₂	Fraction inspirée en oxygène
FR	Fréquence respiratoire (/min)
<i>HIF1α</i>	<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha (gene)</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
<i>IL1B</i>	Interleukine-1β (gène)
IL-1β	Interleukine-1β (protéine)
<i>IL6</i>	Interleukine-6 (gène)
IL-6	Interleukine-6 (protéine)
<i>IL8</i>	Interleukine-8 (gène)
IL-8	Interleukine-8 (protéine)
LNHD	Lunette nasale à haut débit
LPS	Lipopolysaccharides
LVEDD	<i>Left ventricular end diastolic dimension</i> / Diamètre télédiastolique du ventricule gauche
LVEDP	<i>Left Ventricular End Diastolic Pressure</i> / Pression télédiastolique du ventricule gauche
MMH	Maladie des membranes hyalines
PAS	Pression artérielle systémique
PEEP	Pression positive de fin d'expiration
PFC	Perfluorocarbone
PFOB	Bromure de perfluorooctyle
PIP	Pression inspiratoire de pointe
PPCn	Pression positive continue nasale
PVC	Pression veineuse centrale
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> / Espèces réactives nitrogénées
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> / Espèces réactives oxygénées
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription-quantitative polymerase chain reaction</i>
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SOD	Superoxyde dismutase
tau	Constante de temps de la pression intra-ventriculaire gauche durant la phase de relaxation iso-volumétrique du ventricule gauche
Ti	Temps inspiratoire

TIE	Tomographie d'impédance électrique
<i>TNFA</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (gène)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (protéine)
V/Q	Rapport ventilation/perfusion
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VG	Ventilation gazeuse
VIBI	<i>Ventilator-induced brain injury</i>
VILI	<i>Ventilator-induced lung injury</i>
VL	Ventilation liquidienne
VLP	Ventilation liquidienne partielle
VLT	Ventilation liquidienne totale
VMI	Ventilation mécanique invasive
V _{min}	Ventilation minute
VNI	Ventilation non invasive
VOHF	Ventilation par oscillations à haute fréquence
VPP _{in}	Ventilation par pression positive intermittente par voie nasale
V _T	Volume courant

« *À moi... de moi...* »

*« Le problème avec le monde c'est que les gens intelligents sont plein de doutes,
alors que les imbéciles sont pleins de certitudes. »*
Charles Bukowski

REMERCIEMENTS

- J'aimerais remercier le **Fonds de Recherche du Québec – Santé**, pour ma bourse d'étude.
- **Dr. Étienne Fortin-Pellerin**, je te remercie d'avoir été aussi présent tout au long de mon doctorat. Ton écoute et tes conseils m'auront permis de réaliser mes projets les plus ambitieux autant au niveau académique que professionnel. Je me considère extrêmement chanceux d'avoir été ton premier étudiant en carrière et je vais garder un excellent souvenir du temps que nous avons passé ensemble au laboratoire. Je me suis fait un véritable ami avec bien des passions communes pour le futur...
- **Dr Jean-Paul Praud**, du début de ma maîtrise jusqu'à la fin de mon doctorat tu auras su faire sortir le meilleur de moi... Non sans heurts... mais toujours avec une ferme volonté de me pousser au maximum de mes capacités. Ta rigueur digne de mention n'aura jamais cessé de m'impressionner durant toutes ces années. Je n'ai pas encore percé le mystère du comment tu arrives à joindre tous les bouts, mais une chose est certaine, je te remercie pour toutes ces années où tu as su être présent à tous les instants.
- **Pr Philippe Micheau**, merci d'avoir été mon directeur du début de ma maîtrise jusqu'à la fin de mon doctorat. Nos champs d'expertise complètement différents se seront néanmoins toujours retrouvés à la table de discussion. Merci infiniment de m'avoir donné ma chance en début de parcours, je suis très fier d'avoir pu contribuer à faire avancer les connaissances en VLT à tes côtés.
- Je remercie le **Dr Philippe Jovet**, le **Dr Frédéric Dallaire** et le **Pr Ahmed Chraïbi** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.
- Je remercie mon comité d'encadrement, les **Prs Abdelaziz Amrani** et **Alain Frigon** d'avoir accepté ce rôle. Un merci tout particulier au Pr Amrani de m'avoir épaulé dans ma réorientation de laboratoire à un moment critique où je ne savais plus quoi faire. Il aurait été facile de me laisser aller seul, mais tu as préféré m'aider et m'encourager et cela a fait toute la différence pour moi. Je reste très fier d'avoir été, à un certain moment, ton étudiant la semaine et ton mécanicien la fin de semaine.
- À mes collègues du laboratoire Praud : **Nathalie** et **Charlène**, merci pour tout. Nous n'avions pas toujours la même méthodologie de travail, mais une chose est certaine c'est qu'ensemble il n'y a pas une expérimentation aussi complexe qui soit qui ne pouvait pas être réalisée! Votre support m'a été grandement utile tout au long de mon parcours et je vous en remercie.

- Je remercie mes collègues et amis, **Mathieu, Jonathan, Julien, Danny, Christophe, Charles, Wendy, Samuel, Mikhail-Paul** ! J'ai passé d'excellents moments avec vous tous. Je garderai un excellent souvenir des conversations de bureau et les 5 à 8...9...10h... ! ...!
- Je tiens à remercier ma famille, tout particulièrement, mes parents, **Manon et Benoît**. Vous m'avez donné les ailes pour me rendre où j'ai toujours voulu aller. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi durant toutes ces années de travail acharné. Il n'était pas toujours facile de comprendre, pour vous, ce que je vivais, malgré tout vous m'avez toujours supporté sans ajouter de pression. À mon frère **Maxime** et ma sœur **Annie-Pier**, merci d'être qui vous êtes, vos mots d'encouragements auront toujours été très appréciés alors que mes études ne semblaient jamais avoir de fin. Je remercie aussi mes **grands-parents Madore** pour l'éthique de travail et pour m'avoir appris que l'important ce n'était pas de savoir quand la journée allait se finir, mais de la terminer quand le travail était bien accompli.
- À ma conjointe, **Stéphanie**, merci! Comme l'adage le dit si bien : « Derrière chaque grand homme se cache une grande femme » et bien c'est tellement vrai alors que tu auras toujours été là pour me rappeler les étapes à suivre, pour m'épauler dans les moments les plus demandant, et ce avec ton habituel sourire. Merci à toi pour toutes ces années de bonheur.
- Je remercie mes amis de toujours : **Jérémy, Savage, Maxime, Félix, Roland, Louis-Joseph** et tous les autres avec qui j'ai eu autant de plaisir durant toutes ces années.
- Je remercie mes amis aux études graduées : **Jade, Michèle, Samuel, Alexandre, Louis, Sam Pic, Fanny** et tous les autres. Vous êtes les héros méconnus qui étaient toujours là pour me donner le produit, l'appareil, l'instrument ou encore la bière quand j'en avais vraiment besoin...
- **Jimmy**... Tout simplement merci ! Si ce n'était pas de toi, je serais probablement encore débosseleur dans un garage. Tu auras été la bougie d'allumage à toute cette aventure. Sans ton influence je ne serais clairement pas où je suis aujourd'hui et pour ça je ne t'en serai jamais assez reconnaissant.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

La dysplasie bronchopulmonaire (DBP) ou maladie pulmonaire chronique du prématuré est une condition qui affecte la qualité de vie des patients atteints (Landry et al. 2011). Bien que les causes soient multifactorielles, l'un des principaux acteurs demeure la prise en charge respiratoire impliquant la ventilation mécanique par tube endotrachéal et l'administration de grandes concentrations d'oxygène. La croissance normale des poumons est alors compromise et un développement pathologique s'ensuit (Davidson et Berkelhamer 2017). Avec l'amélioration des soins de santé, les taux de survie des prématurés ont augmenté. Malheureusement, les taux de DBP demeurent élevés (Kennedy et al. 2016). La ventilation liquidienne totale (VLT), qui assure la ventilation alvéolaire et les échanges gazeux *via* le va-et-vient d'un perfluorocarbène (PFC) liquide, a démontré sa supériorité par rapport à la ventilation gazeuse (VG) dans la prise en charge des modèles animaux de détresse respiratoire induit par un déficit en surfactant ou encore par l'aspiration méconiale. La VLT est donc un candidat potentiel dans la prévention de la DBP (Wolfson et al. 2008, Avoine et al. 2011, Zhu et al. 2013). Il reste, cependant, des zones grises à élucider, notamment au niveau des répercussions hémodynamiques associées à l'administration du PFC dense dans les poumons, tout comme les paramètres ventilatoires optimaux à utiliser. Avec l'avancement de la technologie en VLT, il est maintenant possible d'effectuer un suivi étroit des volumes liquidiens pulmonaires, ouvrant la porte au raffinement des techniques de ventilation. Par le passé, la quantité de liquide introduite dans les poumons était approximative et le suivi insuffisant du volume pulmonaire pouvait mener à une accumulation délétère (surdistension pulmonaire). Il est primordial d'établir les bonnes modalités de VLT d'abord chez l'agneau à terme afin de maximiser les chances de succès chez l'agneau extrême prématuré, puis chez l'humain. Les projets de doctorat présentés dans cette thèse proposent donc (1) d'évaluer les répercussions hémodynamiques, (2) d'évaluer la distribution du volume pulmonaire liquidien et gazeux lors du remplissage à l'initiation de la VLT et (3) de déterminer quelles sont les valeurs optimales de volume courant (V_T) et de fréquence respiratoire (FR) pour assurer les échanges gazeux tout en limitant la réponse inflammatoire pulmonaire et évaluer l'impact des modalités de ventilation sur le retour en respiration spontanée.

1.1 Dysplasie bronchopulmonaire

1.1.1 Définition

La dysplasie bronchopulmonaire a été décrite pour la première fois en 1967 par Northway, Rosan et Porter comme une maladie pulmonaire chronique suivant la prise en charge de la maladie des membranes hyalines (MMH) (Northway et al. 1967). À l'époque, la MMH était extrêmement létale et les nouveau-nés atteints de forme sévère ne survivaient tout simplement pas. Avec l'arrivée des traitements par surfactants exogènes, l'utilisation croissante des modalités de soutien respiratoire non-invasif et de la corticothérapie anté- et post-natale, des nouveau-nés extrêmement prématurés (de 23, voir 22 semaines d'âge gestationnel) peuvent maintenant survivre (Abman et al. 2017). De nos jours, le diagnostic de dysplasie bronchopulmonaire est souvent établi en présence d'une oxygénodépendance à 28 jours de vie et le degré de sévérité est défini par le niveau de support respiratoire à 36 semaines d'âge corrigé (Jobe et Bancalari 2001). Cette maladie chronique surtout associée à la prématurité extrême demeure à ce jour l'un des principaux défis en néonatalogie. On la retrouve maintenant principalement chez les nourrissons nés avec un faible poids (< 1500 g) (Jensen et Schmidt 2014) et chez 72 % des bébés nés entre 22 et 24 semaines de gestation (Younge et al. 2017). Les causes menant à l'apparition de la DBP sont multifactorielles et la définition actuelle ne tient toujours pas compte des enfants qui meurent avant 36 semaines ou encore ne prédit pas le devenir à long terme. Cela contribue à alimenter le débat sur la vraie définition de la DBP depuis des années (Jobe 2016).

1.1.2 Conséquences à long terme

Les patients atteints de dysplasie bronchopulmonaire ont une hospitalisation initiale plus longue que les patients non atteints (Cotten et al. 2005). Certains doivent partir à la maison avec un supplément en oxygène pour des semaines, voire des mois, ce qui contribue à la diminution de la qualité de vie des patients et des parents. Ils présentent aussi un taux de ré-hospitalisation plus élevé, ce qui engendre un coût supplémentaire considérable pour le système de santé. Jusqu'à 50 % des patients atteints de DBP seront ré-hospitalisés dans les deux premières années de vie, parfois à de multiples reprises (Smith et al. 2004, Resch et al. 2016); en effet, ces patients demeurent plus à risque de développer des complications

respiratoires sévères lors de contact avec des virus communs tels que le virus respiratoire syncytial, le virus influenza et le rhinovirus (Miller et al. 2012, Stein et al. 2017, Townsi et al. 2018).

Les patients avec DBP sont aussi plus à risque de développer des symptômes normalement associés à l'asthme (asthma-like symptoms) durant l'âge préscolaire et scolaire (Vom Hove et al. 2014, Lombardi et Fainardi 2018). Des symptômes comme une respiration sifflante, la toux et l'essoufflement sont fréquemment rencontrés dans cette population alors que l'hyperréactivité bronchique et le bronchospasme déclenché par l'exercice, sont aussi souvent décelés lors de l'examen paraclinique (MacLean et al. 2016).

Plusieurs études sur la fonction pulmonaire mesurée par spirométrie chez les extrêmes prématurés ont montré un déclin avec l'âge (Hirata et al. 2017). Parmi les paramètres mesurés, on retrouve la capacité vitale forcée, le volume expiratoire maximal en 1 sec et le débit expiratoire maximal médian entre 25 et 75% de la capacité vitale. Tous les paramètres montraient une diminution significative par rapport au groupe témoin. Il y a d'ailleurs une association entre une fonction respiratoire réduite en bas âge et le risque de développer une maladie pulmonaire obstructive chronique précocement à l'âge adulte (Bui et al. 2018).

Finalement, la complexité de la prise en charge respiratoire, la malnutrition ou encore le retard de croissance postnatal constituent des éléments pouvant nuire au développement psychomoteur de l'enfant et aux performances scolaires (Short et al. 2003).

En plus des répercussions chez l'enfant atteint, la DBP présente un coût certain pour la société en plus d'infliger un stress important aux parents qui doivent composer avec cette réalité chez leurs enfants. **Il est impératif de trouver des thérapies qui permettront de diminuer l'incidence de la DBP chez les extrêmes prématurés.**

1.2 Physiopathologie de la dysplasie bronchopulmonaire

Afin de bien comprendre la physiopathologie de la dysplasie bronchopulmonaire, il faut d'abord comprendre le développement normal des poumons, l'importance du surfactant et comment une carence en surfactant peut mener à la MMH. Ces éléments seront abordés dans cette section.

1.2.1 Développement pulmonaire

Il est possible de diviser le développement pulmonaire en 5 étapes distinctes, s'échelonnant des premières semaines de gestation jusqu'à l'adolescence (voir figure 1) (Schittny 2017). La première est la phase embryonnaire a lieu chez l'humain entre la 4^e et la 7^e semaine d'AG. Durant cette phase, à l'extrémité caudale du diverticule laryngotrachéal, il y a formation d'un bourgeon à partir duquel apparait la trachée, les bronches principales (gauche et droite) et les voies aériennes principales. Le tout étant, à ce stade, formé principalement d'un épithélium indifférencié. La phase pseudo-glandulaire suit entre la 5^e et la 17^e semaine d'AG où l'établissement de l'arbre bronchique et des bronches a lieu. À ce stade, un épithélium cylindrique plus spécialisé (cilié, non cilié et basal) de même que les premières cellules neuroendocrines apparaissent en proximal. En distal, apparaissent plutôt les premières cellules épithéliales cubiques qui sont les précurseurs des pneumocytes de type II, responsables de la sécrétion du surfactant. La 3^e phase entre la 16^e et la 26^e semaine d'AG, appelée phase canaliculaire, est caractérisée par l'apparition du système vasculaire adjacent au système respiratoire. Ainsi, les premiers capillaires sanguins viennent englober les premiers acini pulmonaires¹ formés par le rétrécissement des bourgeons distaux. Au niveau cellulaire, en proximal, on retrouve les mêmes cellules qu'à la phase pseudoglandulaire, alors qu'en distal les cellules épithéliales cubiques se différencient en pneumocytes de type 1. La phase sacculaire, débutant autour de la 23^e - 24^e semaine d'AG, va s'échelonner jusqu'à la 38^e semaine d'âge gestationnel. Des saccules alvéolaires qui sont des amas d'alvéoles grossiers capables d'effectuer des échanges gazeux vont apparaître. Dans les voies aériennes distales, les pneumocytes-1 s'aplatissent pour former la paroi des alvéoles alors que les

¹ Acinus pulmonaire : Formé par l'ensemble des unités respiratoires élémentaires dérivant d'une bronchiole terminale. Chaque acinus comprend plusieurs générations (3 à 4) de bronchioles respiratoires, prolongées par un canal alvéolaire dont le bourgeonnement donnera un peu plus tardivement naissance aux sacs alvéolaires.

pneumocytes-2, s'étant développés à partir des cellules épithéliales cubiques, mûrent afin de produire les premières molécules de surfactant. Finalement, la 5^e phase alvéolaire vient compléter le développement pulmonaire de la 36^e semaine d'AG jusqu'au début de l'âge adulte. En effet, cette phase alvéolaire porte bien son nom étant donné la formation de septa alvéolaires où les saccules se divisent en plusieurs petits alvéoles. Cette étape très importante du développement contribue à la multiplication de la surface d'échange pulmonaire entre le nouveau-né et l'adulte (Plosa et Guttentag 2018). Les enfants nés à la 23^{ème} semaine d'âge gestationnel environ sont donc à la limite de la viabilité.

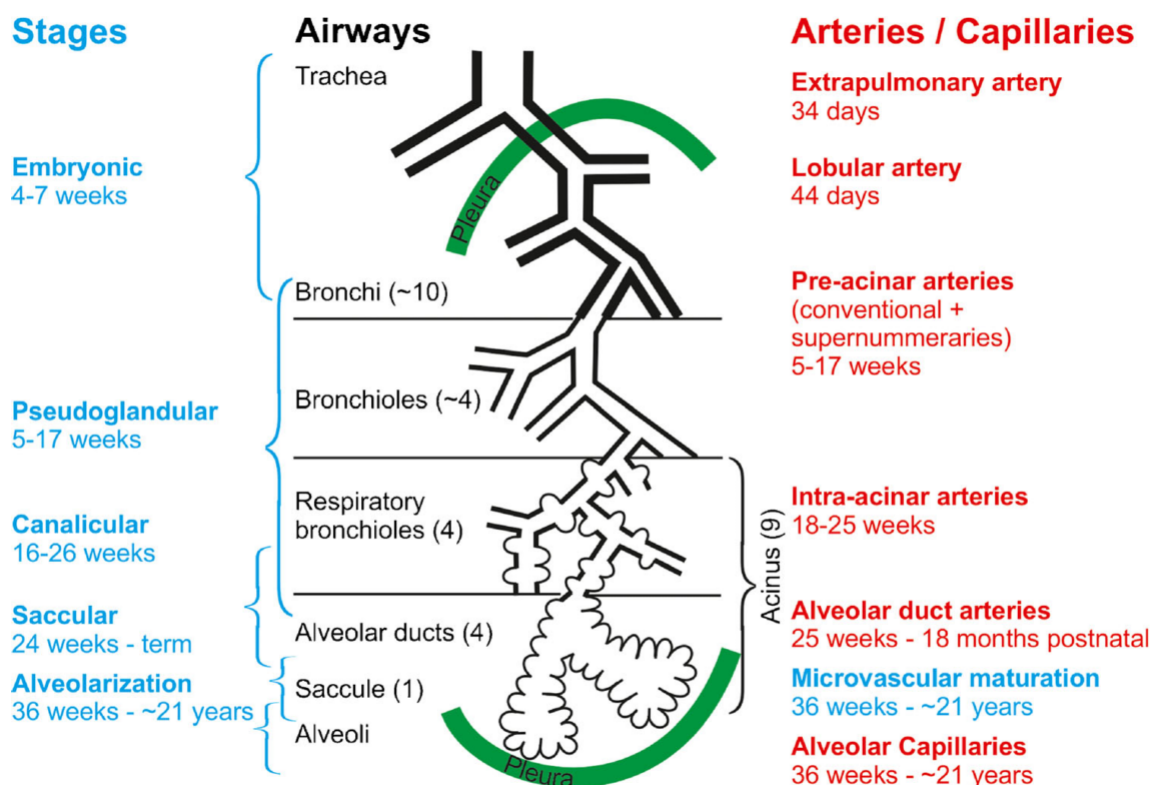


Figure 1. Développement des voies aériennes et des artères pulmonaires

En bleu, les étapes de développement des voies aériennes. En noir, les voies aériennes et en rouge les artères pulmonaires. En moyenne, les voies aériennes chez l'homme comptent 23 générations (18-30 générations) entre la trachée et les saccules alvéolaires. Figure de Schittny JC: Development of the lung. Cell Tissue Res 2017, 367(3):427-444 (Schittny 2017). Contenu en libre accès de Cell tissue Research.

Toute interférence dans les étapes mentionnées ci-dessus peut mener à un développement pathologique du poumon. Le degré d'altération du développement dépend alors de l'âge gestationnel du nourrisson et des facteurs anténataux (ex. prédisposition

génétique) ou encore postnataux (ex. ventilation mécanique invasive) tels que décrits dans la figure 2. Ces expositions, ajoutées à une susceptibilité génétique, peuvent causer des dommages directs aux voies aériennes tout comme au parenchyme et induire une altération du développement normal. Les prématurés nés à un âge gestationnel de 23 à 30 semaines (région indiquée en rouge : *Premature delivery*) durant la phase canaliculaire et sacculaire du développement pulmonaire sont plus à risque de développer une dysplasie bronchopulmonaire (Bancalari et al. 2003, Baraldi et Filippone 2007).

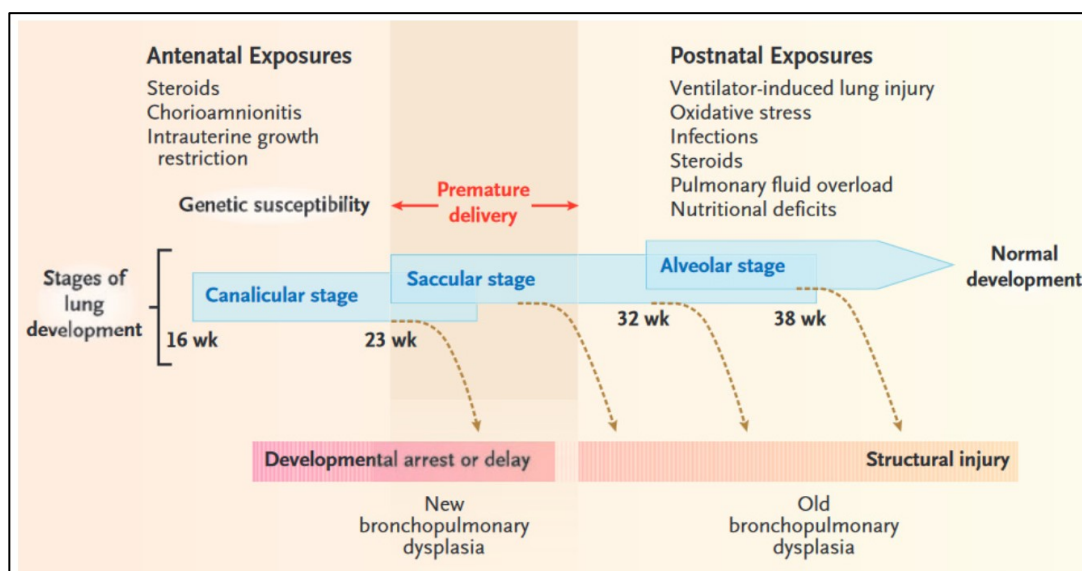


Figure 2. Stades de développement pulmonaire, facteurs potentiellement dommageables et types de dommages pulmonaires associés

Reproduit avec la permission d'Eugenio Baraldi, M.D.; Marco Filippone, M.D. Chronic Lung Disease after Premature Birth. N. Engl. J. Med. 2007, 357, 1946–1955. Copyright © 2007 Massachusetts Medical Society (Baraldi et Filippone 2007).

1.2.2 Maladie des membranes hyalines

La maladie des membranes hyalines (MMH) est intimement liée à la carence en surfactant endogène du prématuré. Cette section s'attarde d'abord au surfactant pulmonaire, sa composition, ses fonctions et ensuite à la carence en surfactant responsable de la MMH chez les extrêmes prématurés. Finalement, cette section traitera du dommage induit par la ventilation mécanique invasive (VMI).

1.2.2.1 Surfactant pulmonaire

Le surfactant pulmonaire est sécrété par les pneumocytes de type 2 à partir de la 22-23^e semaine d'AG. Il est composé de protéines (environ 5-10 % : SP-A, SP-B, SP-C et SP-D), de phospholipides (environ 40 %), de la 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (environ 40 %) et de cholestérol (environ 5 %). Il forme une structure physique aux propriétés indispensables à l'homéostasie pulmonaire. Il assure le maintien d'une tension de surface faible et variable tout au long du cycle respiratoire tout en faisant partie du système immunitaire inné (Chroneos et al. 2010).

Le surfactant diminue la tension de surface et prévient le phénomène d'atélectasie² en plus d'améliorer la distribution du V_T (Whitsett et al. 2015).

Les protéines SP-B et SP-C sont très importantes pour les propriétés tensioactives du surfactant. Elles facilitent la répartition du surfactant en permettant la redistribution des lipides durant l'inspiration afin que les molécules tapissent les alvéoles de façon uniforme. La protéine SP-B est indispensable au bon fonctionnement du surfactant. D'ailleurs, les souris avec invalidation génique pour ce gène ne sont pas viables (Clark et al. 1995). Chez l'homme, le déficit en protéine SP-B est rare (1 cas / 1 million de naissance) et est généralement létal dans les mois suivant la naissance (Kurath-Koller et al. 2015). Le rôle de la protéine SP-C est moins bien compris et elle ne semble habituellement pas essentielle à la survie (Glasser et al. 2001). On considère tout de même qu'elle possède un rôle important pour maintenir une activité optimale du surfactant. SP-A et SP-D sont, pour leur part, très impliquées dans la réponse immunitaire grâce à leur rôle d'opsonification qui favorise la phagocytose d'agents pathogènes (Kishore et al. 2006).

1.2.2.2 Déficit en surfactant

Le manque de surfactant, principalement lié à la différenciation incomplète des pneumocytes de type 2, est intimement lié à la maladie des membranes hyalines chez les extrêmes prématurés. Cette détresse respiratoire affecte jusqu'à 7 % des nouveau-nés, mais

² Atélectasie : Expansion incomplète d'une partie ou de tout un poumon

est beaucoup plus fréquente chez les extrêmes prématurés (Reuter et al. 2014). Tel que mentionné dans les sections précédentes, la sécrétion du surfactant commence environ à la 23^e ou 24^e semaine de gestation. Bien qu'à partir de ce moment une certaine quantité de surfactant soit relâchée dans l'espace alvéolaire, il y en a souvent trop peu pour assurer une diminution de la tension de surface adéquate et permettre aux alvéoles de rester ouvertes durant le cycle respiratoire. Cette tension de surface augmentée et les phénomènes de fermeture et de réouverture des alvéoles qui s'ensuivent contribuent à endommager les cellules épithéliales et endothéliales formant la barrière alvéolo-capillaire causant ainsi une nécrose cellulaire. L'accumulation de débris cellulaires provoque une inflammation via l'infiltration de macrophages et de neutrophiles. À leur tour, ces cellules relâchent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-alpha, l'IL-1 β , IL-6, IL-8 et l'IL-10 de même que des agents oxydants et des protéases (Polglase et al. 2009). Cela contribue à détériorer la membrane basale permettant la formation d'un exsudat dans les alvéoles. En plus de l'exsudat, l'accumulation de débris cellulaires et de fibrine forme des membranes hyalines (figure 3). Une partie des cytokines relâchée peuvent aussi atteindre la circulation systémique et affecter d'autres organes. Ce phénomène est appelé biotrauma. Lorsque l'inflammation crée du dommage au cerveau, il est alors question de *ventilator induced brain injury* (VIBI) (Aronson et Rajwani 2017).

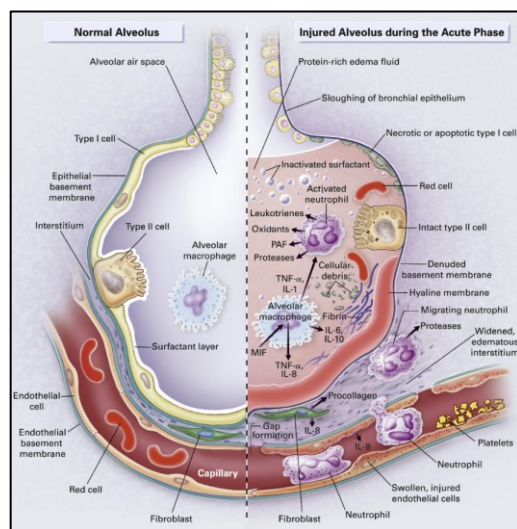


Figure 3. Dommage alvéolaire et membranes hyalines

À gauche, alvéole normale, à droite, alvéole endommagée. Reproduit avec la permission de Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000, 342(18):1334-1349, Copyright © 2000 Massachusetts Medical Society (Ware et Matthay 2000).

Du point de vue d'un clinicien, la MMH se caractérise par une détérioration de l'oxygénation accompagnée de signes de détresse respiratoire comme la tachypnée, un tirage sus-sternal et sous-sternal de même qu'un battement des ailes du nez. Un des signes importants est le geignement expiratoire causé par la fermeture de la glotte durant l'expiration. Ce mécanisme permet d'aider le patient à maintenir une capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) suffisamment élevée, nécessaire au maintien des échanges gazeux. Des opacités alvéolaires bilatérales diffuses qui progressent rapidement sont visibles à la radiographie (figure 4). Bien que l'instauration d'une ventilation non invasive³ soit priorisée, elle n'est pas toujours suffisante chez les extrêmes prématurés où la vaste majorité de ceux ayant un âge gestationnel entre 22-24 semaines va devoir être intubé (Younge et al. 2017, Ciuffini et al. 2018). À ce stade, tout sera mis en œuvre pour limiter les dommages pulmonaires associés à la VMI. Mais chez les patients plus malades, le clinicien sera souvent amené à utiliser de fortes concentrations d'oxygène et des pressions inspiratoires importantes (Tracy et Berkelhamer 2019).

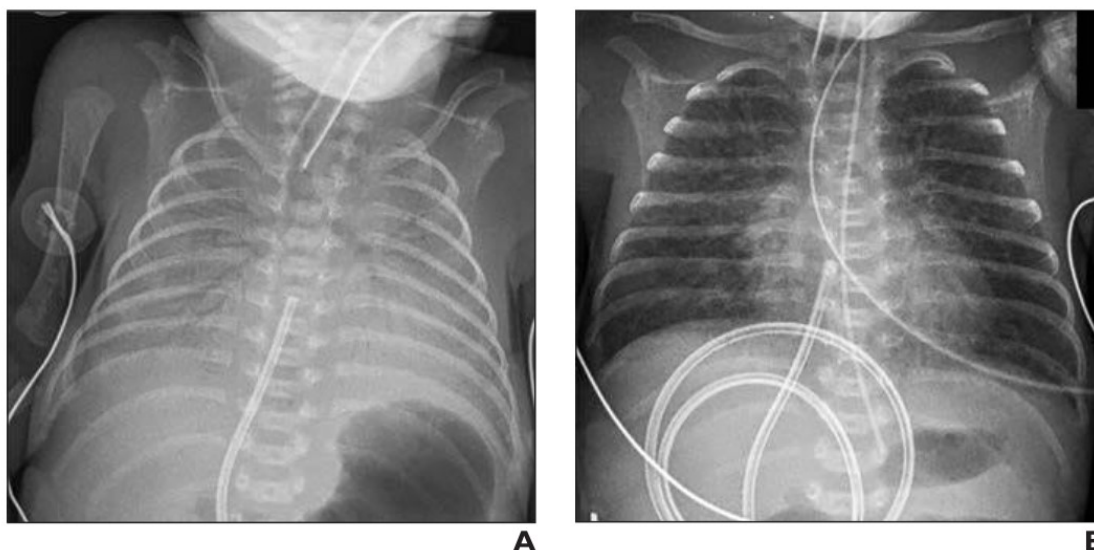


Figure 4. Radiographie d'un enfant né à 26 semaines d'âge gestationnel atteint de MMH

A. Radiographie antéro-postérieure obtenue après la naissance montrant des opacités bilatérales diffuses avec présence de bronchogrammes aériens et B. Radiographie antéro-postérieure obtenue à un jour de vie après administration de surfactant exogène montrant une amélioration de l'aération pulmonaire. Reproduit avec la permission de Liszewski et al. (Liszewski et Lee 2018).

³ Ventilation non invasive : Ensemble des méthodes d'assistances respiratoires qui ne nécessitent pas l'insertion d'un tube endotrachéal dans la trachée

1.2.3 Dommage induit par l'oxygène et la ventilation mécanique

Le déficit en surfactant du patient né extrêmement prématuré complique grandement le passage à la vie extra-utérine. La ventilation mécanique invasive, bien que souvent indispensable au maintien de la vie à court terme, peut en elle-même contribuer à endommager les poumons (*ventilator-induced lung injury* – VILI). Dans cette section, il sera question du rôle de l'oxygène et de la ventilation mécanique dans la physiopathologie de la DBP.

1.2.3.1 Oxygène

L'augmentation de la fraction inspirée en oxygène (FiO_2), nécessaire au maintien d'une saturation artérielle en oxygène acceptable [91-95%] chez les extrême prématurés, contribue au développement de la DBP (Manja et al. 2017). Des études effectuées chez des modèles animaux murins ont démontré que l'administration seule d'oxygène à forte concentration était suffisante pour induire un phénotype comparable à ce que l'on retrouve chez des patients atteints de DBP, tel qu'un développement alvéolaire et vasculaire déficient (Ambalavanan et Morty 2016, Bhandari 2016). Cela vient du fait que l'oxygène peut mener à la création de radicaux libres comme les espèces réactives oxygénées (ROS) et les espèces réactives azotées (RNS) qui sont toutes considérées comme des agents oxydants.

Radicaux libres, espèces réactives oxygénées (ROS) et espèces réactives azotées (RNS) :

Les radicaux libres comme les ROS et les RNS sont des molécules qui possèdent un électron supplémentaire ce qui leur donne une propriété oxydante. Pour l'oxygène, si il acquiert un électron supplémentaire, il passe de la conformation O_2 (stable) à O_2^- (instable) qui est alors considéré comme une espèce radicalaire simple appelée anion superoxyde (Phaniendra et al. 2015). En l'absence d'agent antioxydant comme les superoxydes dismutases qui permet la dismutation de l'électron supplémentaire, les radicaux libres peuvent affaiblir des molécules indispensables à l'intégrité cellulaire comme l'ADN, les protéines, les glucides et les lipides (figure 5). Par exemple, les radicaux libres peuvent oxyder et modifier les protéines de 3 façons : 1) oxydation d'un acide aminé, 2) clivage peptidique médié par les radicaux libres ou encore 3) par la formation de liaisons croisées médiées par des produits de peroxydation lipidique. Les protéines riches en méthionine,

cystéine, arginine et histidine sont particulièrement vulnérables à l'oxydation (Freeman et Crapo 1982). Les protéines oxydées sont plus susceptibles à la protéolyse. Leur activité biologique peut aussi être affectée et contribuer aux dommages membranaires et altérer plusieurs processus cellulaires (Lobo et al. 2010). En l'absence d'antioxydant, les radicaux libres peuvent donc interférer avec bon nombre de mécanismes physiologiques. Par exemple, chez les extrêmes prématurés, les radicaux libres entraînent une augmentation de la perméabilité vasculaire. Cette perméabilité accrue permet l'infiltration de cellules inflammatoires (macrophages / cellules polymorphonucléaires) et de cytokines pro-inflammatoires capables d'endommager les alvéoles. De plus, la ventilation avec des concentrations supra-physiologiques d'oxygène est associée à l'initiation du processus de fibrose impliqué dans la DBP (Perrone et al. 2012). Elle contribue aussi à oxyder les protéines du surfactant comme SP-A qui perd alors ses fonctions et cause une diminution de la production de phospholipides indispensables à l'activité tensio-active du surfactant (Haagsman 1998).

L'administration de fortes concentrations d'oxygène altère l'expression normale de gènes impliqués dans le développement pulmonaire. Par exemple, l'*hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α) est indispensable à la production du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) nécessaire à la vascularisation pulmonaire. Une forte concentration d'oxygène mène à la dégradation de la protéine HIF-1 α qui ne peut plus induire l'expression de VEGF. Ce déficit se traduit alors par une diminution de la vascularisation pulmonaire chez les prématurés (Groenman et al. 2007). Une anomalie du développement vasculaire pulmonaire fait partie de la physiopathologie de la DBP (Thébaud et Abman 2007).

L'équilibre entre les agents oxydants et les défenses antioxydantes est primordial afin d'éviter un déséquilibre pouvant être délétère. Malheureusement, les prématurés ont un système antioxydant immature qui ne permet pas de les protéger adéquatement (Perrone et al. 2010). En effet, ils ont moins d'enzymes de protection comme les superoxydes dismutases (SOD), les catalases et les glutathions peroxydases qui sont responsables de la dismutation des radicaux libres. L'expression de ces enzymes de défense augmente de près de 150 %

dans le dernier trimestre de la grossesse (Lee et Davis 2011), c'est pourquoi les extrêmes prématurés en sont déficients.

Finalement, l'hyperoxie est aussi impliquée dans la pathogénie d'autres pathologies associées à la prématurité telles que la persistance du canal artériel, la rétinopathie du prématuré (Saugstad 2006), les leucomalacies périventriculaires, les hémorragies intraventriculaires et l'entérocolite nécrosante (Ozsurekci et Aykac 2016).

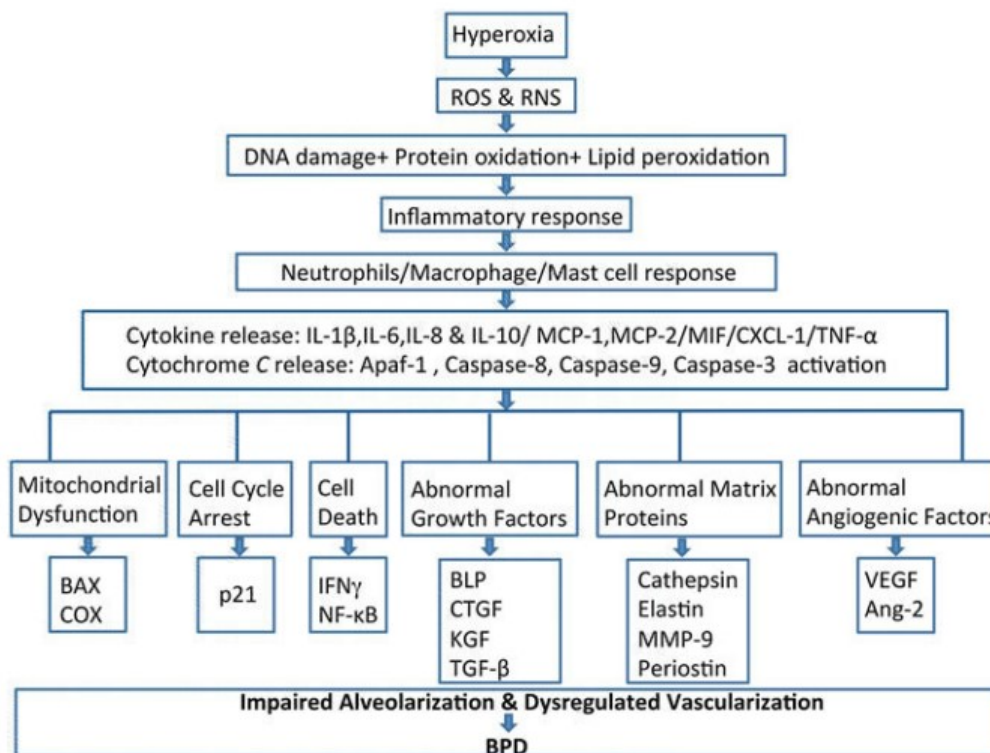


Figure 5. Hyperoxie et développement de la DBP

L'exposition à l'hyperoxie mène à la production d'espèces réactives oxygénées et azotées. Ces radicaux libres peuvent endommager l'ADN, oxyder les protéines et mener à la peroxydation des lipides ce qui se manifeste par une réponse inflammatoire et l'activation des cellulaires immunitaires (neutrophiles, macrophages, mastocytes). Les cellules immunitaires provoquent la relâche de cytokines, de cytochromes C et de caspases. Cela mène à la dysfonction mitochondriale, l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire, un dérèglement des facteurs de croissance et angiogéniques tout comme un dérèglement des protéines de la matrice cellulaire. Tout cela est associé à une expression anormale des gènes : *bcl-2-like protein 4* (BAX), *cyclooxygenase* (COX), *protein 21*, *interferon gamma* (IFN γ), *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), *bombesin-like peptide* (BLP), *connective tissue growth factor* (CTGF), *keratinocyte growth factor* (KGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β), *cathepsin*, *elastin*, *matrix metalloprotease 9* (MMP-9), *periostin*, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), and *angiopoietin 2* (Ang-2). La combinaison de toute la cascade mentionnée ci-dessus mène à un défaut d'alvéolarisation et de vascularisation formant la signature de la DBP. IL : interleukine, MCP : *monocyte chemoattractant protein*, MIF : *Macrophage migration inhibitory factor*, CXCL : *chemokine (C-X-C motif) ligand*, TNF : *Tumor necrosis factor*. Reproduit avec la permission de

Bhandari V: **Bronchopulmonary Dysplasia**. Copyright © 2016, Springer International Publishing (Bhandari 2016).

1.2.3.2 Ventilation mécanique

Chez les patients atteints de MMH, la difficulté à maintenir une CRF et l'hétérogénéité du recrutement alvéolaire compliquent l'établissement d'une ventilation mécanique (Jobe et al. 2008). En effet, la diminution de la compliance pulmonaire⁴ force le clinicien à augmenter la pression inspiratoire nécessaire pour administrer un même V_T . Bien que certaines régions moins compliantes soient alors mieux ventilées, d'autres régions plus compliantes sont assujetties à une surdistension, aussi appelée volutrauma. Finalement, les régions moins compliantes peuvent s'ouvrir à l'inspiration puis être atelectasiées à la fin de l'expiration (Woodring et Reed 1996). Cette ouverture et fermeture répétée des alvéoles peut créer davantage de dommages pulmonaires. Ce phénomène est appelé atelectrauma. Le volutrauma et l'atelectrauma sont les plus souvent associés au VILI. Le barotrauma, causé par une surpression dans les alvéoles, est aussi impliqué dans le VILI mais de façon plus secondaire que le volutrauma. Il y a aussi la vidange brutale des poumons lors des déconnexions du ventilateur qui peuvent créer de l'atelectasie et du dommage pulmonaire (Shaffer et al. 1989, Jobe et al. 2008, Hillman et al. 2010, Chen et al. 2018, Kneyber 2018, Katira 2019).

À elle seule, la VMI à pression positive est suffisante pour obtenir un phénotype de DBP (Jobe 2015).

Il a été démontré que l'administration de quelques grandes insufflations, dès la naissance, était suffisante pour induire une réponse inflammatoire et contribuer à l'apparition du VILI (Hillman et al. 2007, Hillman et al. 2010). L'inflammation pulmonaire peut alors altérer le développement normal des poumons, d'où le terme dysplasie. Plusieurs études chez des modèles animaux (rats et lapins) ont montré que le blocage des récepteurs des médiateurs pro-inflammatoires permettait d'améliorer le phénotype de la DBP (Morty 2018). Cela met en lumière l'implication de la cascade inflammatoire associée à la ventilation mécanique (oxygène et pression positive) dans l'établissement de la DBP. Ainsi, l'initiation de la VMI,

⁴ Compliance pulmonaire : $\Delta \text{Volume (mL)} / \Delta \text{Pression (cmH}_2\text{O)}$

à la naissance, chez les grands prématurés cause une inflammation pulmonaire qui contribue au développement de la DBP.

Bien qu'elle ne soit pas la seule responsable du développement de la DBP, la prise en charge respiratoire agressive (forte pression inspiratoire/concentration d'O₂ élevée) demeure à ce jour l'une des principales causes.

1.2.4 Autres mécanismes impliqués dans la pathogénie de la dysplasie bronchopulmonaire

Bien d'autres mécanismes ont aussi été mis en lumière dans le développement de la DBP. Cette section va donc aborder sommairement les autres causes pouvant mener à la DBP comme le retard de croissance intra-utérin, la nutrition, la prédisposition génétique et d'autres causes moins bien connues.

1.2.4.1 Retard de croissance intra-utérin

Parmi les causes pouvant mener à la DBP, on note le retard de croissance intra-utérin. C'est un phénomène par lequel le fœtus voit sa croissance limitée principalement par une diminution du flux sanguin maternel dans la circulation placentaire. Cette hypoperfusion mène à une diminution des apports en oxygène et en nutriments (Poindexter et Martin 2015). Une production excessive de ROS interfère avec la production normale de facteurs angiogéniques et vasodilatateurs contribuant à une dysfonction endothéliale (Surico et al. 2019). Ainsi, fortement affecté par cette dysfonction endothéliale, le fœtus voit alors sa croissance et son développement limités. Tout comme un faible âge gestationnel, le retard de croissance est associé à un mauvais pronostic respiratoire (Eriksson et al. 2015). Des études ont d'ailleurs montré un risque accru de développer une DBP chez des prématurés avec retard de croissance intra-utérin en comparaison avec des prématurés avec croissance intra-utérine normale (28 % vs. 14 % respectivement) (Reiss et al. 2003, Bose et al. 2009, Eriksson et al. 2015).

1.2.4.2 Nutrition

Il a été montré que la nutrition pouvait également avoir une influence sur le développement de la DBP. Il est aussi connu que les prématurés diagnostiqués avec une DBP

ont une plus faible croissance postnatale que les prématurés sans DBP (Davidson et al. 1990). Les raisons expliquant ce retard de croissance sont un apport calorique insuffisant, des besoins accrus et l'administration de traitements comme les diurétiques et les corticoïdes systémiques postnataux (Poindexter et Martin 2015). Différentes interventions nutritionnelles ont été explorées afin d'améliorer la croissance postnatale (Tyson et al. 1999). Parmi celles-ci, Tyson et al. ont montré que l'administration de vitamine A réduisait le risque de DBP. En effet, l'acide rétinoïque, issu de la vitamine A, est connu pour jouer un rôle clé dans le développement pulmonaire notamment en favorisant la septation des alvéoles (Guimaraes et al. 2012).

1.2.4.3 Prédisposition génétique

Le lien entre une prédisposition génétique et le développement de la DBP a été proposé il y a 40 ans par Nickerson. À l'époque, il a montré une augmentation de l'incidence de l'asthme chez des frères et sœurs de patients souffrants de DBP (n = 17) en comparaison avec ceux des patients qui ont souffert de MMH sans développer de DBP (n = 21). L'étude comportait des lacunes comme le faible nombre de patients étudiés (Nickerson et Taussig 1980). Plusieurs études se sont par la suite intéressées aux gènes prédisposant à la DBP (Shaw et O'Broovich 2013). Deux études en 2006 et 2008 ont examiné des cohortes d'enfants issues de naissances multiples et ont estimé que les facteurs héréditaires pouvaient expliquer 50 à 80 % du développement de la DBP, sans toutefois préciser les haplotypes impliqués (Bhandari et al. 2006, Lavoie et al. 2008). Une étude allemande réalisée entre 1996 et 2005 a analysé des gènes impliqués dans la production du surfactant et de facteurs de croissance, ainsi que dans l'inflammation et l'activité du système immunitaire chez 155 patients avec différents degrés de sévérité de DBP. Cela leur a permis de suggérer que trois PNSs⁵ dans les gènes *TNFA*, *VEGFA* et *TLR10* étaient significativement différents chez les patients atteints de DBP. Or, après correction pour comparaisons multiples, les différences n'étaient plus statistiquement significatives (Mailaparambil et al. 2010). Pour l'instant, aucun haplotype ou PNS n'a réellement été associé à une prédisposition génétique à la DBP.

⁵ Polymorphisme d'un seul nucléotide

La découverte d'une signature génétique pourrait constituer une avancée majeure dans la compréhension et ultimement la prévention de la DBP.

1.2.4.4 Causes moins connues

D'autres causes ont été énoncées dans la littérature comme l'inflammation prénatale en lien avec la chorioamniotite, mais l'implication de cette inflammation sur le développement subséquent de la DBP demeure controversée. En effet, Hartling et al. ont effectué une méta-analyse de 59 études et n'ont pas réussi à démontrer une association claire entre la chorioamniotite et le développement de la DBP (Hartling et al. 2012). Il existe aussi d'autres facteurs de risque comme la prééclampsie et le diabète gestationnel (Eriksson et al. 2014). Le tabagisme chez la femme enceinte, le sexe et l'ethnie peuvent également influencer le développement de la DBP d'un patient à l'autre (Morrow et al. 2017).

1.3 Traitements actuels de la maladie des membranes hyalines

Plusieurs thérapies ont, au fil des années, été introduites pour traiter la MMH, parmi lesquelles on retrouve l'utilisation de ventilation non-invasive et invasive, l'administration de surfactants exogènes et de différents composés (caféine, corticostéroïde) et l'établissement de cibles de saturation artérielle. Ces thérapies ont contribué à augmenter les taux de survie des extrêmes prématurés (Jobe 1999, Bancalari et al. 2003, Ehrenkranz et al. 2011).

1.3.1 Ventilation non invasive

La philosophie de prise en charge actuelle initiale de la MMH vise principalement à limiter le recours à l'intubation afin de minimiser les dommages pulmonaires et neurologiques (VIBI) qui y sont associés (Anderson et Doyle 2006, Ratner et al. 2007). Il est donc conseillé de favoriser des techniques de ventilation non invasive (VNI) qui ne nécessitent pas d'intubation. Dans cette optique, plusieurs techniques ont été mises en place comme la pression positive continue nasale (PPCn), la pression positive intermittente par voie nasale (VPPin) et les lunettes nasales à haut débit (LNHD). Bien que ces techniques de

ventilation soient fortement suggérées, leur réelle efficacité à diminuer les taux de DBP chez les extrêmes prématurés a été modeste (Schmolzer et al. 2013, Lemyre et al. 2017).

1.3.1.1 Pression positive continue nasale

La PPCn est un mode de VNI qui maintient une pression dans les voies aériennes supérieures tout au long du cycle respiratoire. Cela permet de diminuer la résistance des voies aériennes supérieures. Dans un contexte où les poumons des extrêmes prématurés sont immatures avec un déficit en surfactant, la PPCn est utilisée afin de maintenir une CRF plus élevée, améliorer la compliance pulmonaire, l'oxygénation et diminuer le besoin en surfactant (De Paoli et al. 2003, Morley et al. 2008). Une méta-analyse, effectuée par Schmolzer et al., a montré que la PPCn initiée en salle de naissance permettait de réduire le taux de mortalité et de DBP chez les extrêmes prématurés. Ils ont montré qu'en priorisant la PPCn plutôt que l'intubation, il était possible d'éviter le décès d'un nouveau-né supplémentaire sur 25 nouveau-nés et ce à 36 semaines sans qu'il ne développe de DBP (Schmolzer et al. 2013). Elle demeure à ce jour favorisée chez les extrêmes prématurés qui ne souffrent pas d'apnées du prématuré (Shi et al. 2020). Dans ces cas ou encore lorsque le patient souffre de tachypnée, la VNI de type pression positive intermittente nasale est recommandée.

1.3.1.2 Pression positive intermittente nasale

La VPPin est un mode de VNI à deux niveaux de pression. C'est-à-dire que le clinicien doit d'abord régler la pression positive de fin d'expiration (PEEP) qui est la pression qui sera maintenue durant l'expiration. Ensuite, le clinicien doit régler une pression inspiratoire de pointe (PIP) qui est la pression qui sera délivrée lorsque l'inspiration est déclenchée. Finalement, il règle une fréquence de sécurité. Cette fréquence permet de déclencher une inspiration lorsque le patient arrête d'inspirer pour une durée déterminée. Ce mode est donc très fréquemment utilisé en soutien à la PPCn puisqu'elle possède les mêmes avantages en plus d'assurer une fréquence de base permettant de stimuler la respiration et limiter les apnées. Elle permet aussi de diminuer l'effort spontané inspiratoire du patient (Kiciman et al. 1998). La PPCn permet parfois d'éviter l'intubation et la VMI. Elle est aussi très utilisée comme support post-extubation. Ferguson et al. ont d'ailleurs montré, dans une

revue systématique, que la VPPin était supérieure à la PPCn pour éviter la réintubation (Ferguson et al. 2017). La réintubation est associée à un mauvais pronostic chez les extrêmes prématurés (Tapia-Rombo et Hernández-Gutiérrez 2012).

1.3.1.3 Lunettes nasales à haut débit

Les lunettes nasales à haut débit permettent, *via* des canules insérées dans les narines, de fixer un débit d'air (généralement entre 4-6 litres/min) sans avoir de contrôle sur la pression qui est générée. Il est ainsi possible d'ajuster la fraction inspirée en O₂ (FiO₂) selon les besoins du patient (Shi et al. 2020). Bien qu'elle n'ait pas les mêmes avantages au niveau pulmonaire en termes de recrutement et d'amélioration de la CRF que la PPCn et la VPPin, elle demeure très utilisée chez les patients qui ont besoin d'un support respiratoire. Elle permet entre autres d'acheminer un supplément en O₂ en plus de diminuer l'effort inspiratoire. Les LNHD seraient aussi associés à un lavage de l'espace mort anatomique ce qui aiderait aux échanges gazeux. Reynolds et al., ont d'ailleurs réalisé une étude sur l'utilisation des lunettes nasales à haut débit chez des prématurés en salle de naissance. 25 des 28 enfants avec un âge gestationnel inférieur à 30 semaines ont été stabilisés avec succès. Les auteurs ont conclu que c'était possible d'utiliser les lunettes nasales à haut débit dès la naissance chez les extrêmes prématurés bien que d'autres études chez un plus grand nombre d'individus doivent être réalisées pour confirmer ce résultat (Reynolds et al. 2016).

1.3.2 Ventilation mécanique invasive

Dans les cas plus sévères de MMH, l'intubation et la VMI deviennent indispensables. Plusieurs modes ventilatoires ont été utilisés. Parmi tous les modes disponibles, la ventilation en mode pression contrôlée, la ventilation à volume garanti sont des modes de VMI conventionnelle très utilisés en premier recours. À ce stade, il est important d'assurer une ventilation la moins délétère possible par l'administration de surfactant exogène et le maintien d'une ventilation protectrice (V_T ; 4-6 ml/kg, FR ; 40 /min, temps inspiratoire (T_i) 0.35 – 0.40 s, PIP maximale ; 25 cmH₂O et PEEP ; 6 – 7 cmH₂O) (Vitali et Arnold 2005, Keszler 2017). Dans les cas où la VMI conventionnelle ne suffit plus, la ventilation par oscillations à haute fréquence (VOHF) est aussi fréquemment utilisée. Tous ces modes seront présentés dans cette section. L'utilisation d'une stratégie d'hypercapnie permissive est aussi

utilisée et sera discutée dans cette section. Dans tous les cas, le temps sous VMI est tenu au minimum, car il existe une relation entre le temps d'intubation et le mauvais pronostic respiratoire et neurologique (Jensen et al. 2015, Robbins et al. 2015).

1.3.2.1 Ventilation en mode pression contrôlée

La ventilation en mode pression contrôlée est un mode très répandu. Toutefois, avec l'avènement de nouveaux modes respiratoires comme la ventilation à volume garanti, elle est beaucoup moins utilisée. Dans ce mode, le clinicien règle la pression inspiratoire appliquée sur la PEEP aussi réglée. Le V_T est donc dépendant de la pression et peut fortement être affecté si, par exemple, le patient inspire ou pleure. Le V_T peut aussi augmenter après l'administration de surfactant exogène dû à l'amélioration de la compliance pulmonaire. Cela peut se traduire par un volutrauma qui est une des causes importantes de dommages pulmonaires (Dreyfuss et Saumon 1998). Dans une méta-analyse publiée en 2017, il a été déterminé que la ventilation en pression contrôlée était associée, entre autres, à une plus longue durée de ventilation, plus de risques de pneumothorax, plus de décès et un plus haut taux de DBP. Il est depuis recommandé d'utiliser la ventilation en mode volume garanti (Klingenberg et al. 2017).

1.3.2.2 Ventilation en mode volume garanti

La ventilation en volume garanti est devenue possible en néonatalogie avec l'arrivée de ventilateurs avec un débitmètre placé entre le tube endotrachéal et le circuit du ventilateur ce qui permet de mesurer le V_T réel administré au patient. Le ventilateur peut alors contrôler la pression administrée en tenant compte des cycles précédents dans le but de maintenir le V_T le plus stable possible d'un cycle à l'autre. De cette façon, le V_T n'est plus influencé par les pertes dans le circuit (fuites / compliance de la tubulure). En contrôlant les V_T , on diminue de beaucoup la variabilité d'un cycle à l'autre ce qui n'était pas le cas avec un mode en pression contrôlée (Abubakar et Keszler 2001). Cette façon de faire permet de pallier aux changements de compliance qui peuvent être rapides lors du traitement de la MMH chez les extrêmes prématurés (Wheeler et al. 2009). Le maintien d'une ventilation minute stable permet d'éviter les changements de PaCO_2 et pourrait être associé à une meilleure stabilité de la perfusion cérébrale et ainsi réduire les dommages au cerveau. L'utilisation d'un V_T

entre 5 et 6 ml/kg semble être assez répandue malgré l'absence de consensus clair, du moins chez les prématurés de 800g et moins (Keszler et al. 2009). À l'inverse, un V_T trop élevé peut entraîner un volutrauma, source de VILI alors qu'un V_T trop faible (< 4 ml/kg) peut entraîner une augmentation du travail respiratoire et une hypoventilation alvéolaire, ainsi qu'un atelectrauma, source aussi de VILI (Chowdhury et al. 2012). La ventilation en mode volume garanti est à prioriser sur la ventilation en mode pression contrôlée car elle est associée à un plus faible taux de DBP et de mortalité. Il reste toujours des études à faire pour évaluer si ce mode permet réellement de limiter le VIBI (Klingenberg et al. 2017).

1.3.2.3 Ventilation par oscillations à haute fréquence

La ventilation par oscillations à haute fréquence est une ventilation mécanique non conventionnelle qui utilise un petit V_T , inférieur à l'espace mort anatomique, délivré à une vitesse très rapide (180-900 respirations/minute)(Wong et al. 2020). C'est un type de ventilation utilisé comme dernier recours pour prendre en charge les détresses respiratoires comme la MMH de l'extrême prématuré (Cotten et Clark 2001). Elle permet l'ouverture des voies aériennes et le recrutement alvéolaire via l'utilisation d'une pression moyenne élevée (Rettig et al. 2015). Une méta-analyse n'a cependant pas mis en lumière sa supériorité par rapport à la ventilation en mode volume garanti (Cools et al. 2010).

1.3.2.4 Hypercapnie permissive

L'utilisation de la VMI est très souvent associée à l'hypercapnie permissive, c'est-à-dire que le clinicien accepte une capnie supérieure à la normale, soit > 52 mmHg plutôt que < 48 mmHg (Carlo et al. 2002, Seger et Soll 2009, Kennedy et al. 2016). En acceptant une capnie supérieure à la normale, il est possible de diminuer les besoins en termes de ventilation alvéolaire et conséquemment utiliser une ventilation moins agressive (diminution du VILI et du VIBI en particulier). Il est important de spécifier que l'élévation de la PaCO_2 va être tolérée dans la mesure où le pH reste supérieur à 7.25. Cette pratique est très utilisée même si curieusement aucune évidence n'a démontré que l'hypercapnie permissive permet de diminuer la fréquence de survenue de la DBP (Logan 2018). De nouvelles études tendent plutôt à démontrer que de viser des paramètres physiologiques normaux dans les premiers

jours de vie serait favorable au bon développement neurologique des extrêmes prématurés (Logan et al. 2017).

1.3.3 Surfactants exogènes

L'administration de surfactant exogène a grandement amélioré le devenir des patients nés prématurément, notamment en diminuant le taux de mortalité et de développement de la DBP. Son utilisation fait maintenant partie des recommandations officielles (Schmolzer et al. 2013, Whitsett et al. 2015). Bien que traditionnellement l'administration de surfactant impliquait l'intubation, beaucoup d'études ont développé des méthodes alternatives comme la méthode LISA (*Less Invasive Surfactant Administration*) ou MIST (*Minimally Invasive Surfactant therapy*) où on guide un cathéter dans les voies aériennes à l'aide de forceps afin d'administrer le surfactant durant la PPCn (Dargaville et al. 2013, Aldana-Aguirre et al. 2017). Les résultats ont démontré que ces techniques permettent une diminution des taux de mortalité et d'incidence de la DBP en comparaison avec la méthode standard impliquant l'intubation et l'administration de surfactant sous ventilation invasive (Aldana-Aguirre et al. 2017). En combinaison avec un support respiratoire non invasif, le surfactant s'est avéré efficace dans les cas moins sévères (Isayama et al. 2015).

1.3.4 Caféine

La caféine est une molécule à la structure très proche de celle de l'adénosine. Elle agit comme un inhibiteur non spécifique sur deux des quatre récepteurs connus de l'adénosine (A1 et A2A) présents dans plusieurs régions du cerveau. Ceci lui permet d'avoir des effets directs sur le système cardiorespiratoire. La caféine augmente, entre autres, la contractilité du diaphragme et la réponse à la PaCO₂. Son administration permet de prévenir les événements cardiorespiratoires du prématuré (Eichenwald 2016). Elle est aussi associée à une augmentation du volume d'éjection systolique ventriculaire gauche. D'un point de vue clinique, la caféine s'est avérée efficace pour réduire le temps sous ventilation invasive (Schmidt et al. 2006). L'utilisation de la caféine améliore le développement moteur et cognitif chez les extrêmes prématurés à 18 mois de vie (Schmidt et al. 2007). Elle est considérée comme étant l'un des rares médicaments ayant prouvé qu'il peut réduire le risque

de DBP à 36 semaines d'âge post-menstruel lorsqu'administré dans les trois premiers jours de vie (Moschino et al. 2020). Cependant, aucun consensus n'a encore été obtenu quant à son protocole d'utilisation. La posologie et le moment d'administration demeurent variables d'une étude à l'autre et devront encore faire l'objet de recherches (Moschino et al. 2020).

1.3.5 Corticostéroïdes

L'administration anténatale de corticostéroïdes a été une avancée importante dans les soins périnataux en contribuant à diminuer les taux de mortalité, de détresse respiratoire, d'hémorragie intraventriculaire et d'entérocolite nécrosante. Les corticoïdes anténataux n'ont cependant pas réussi à diminuer le taux de DBP (Roberts et al. 2017).

Durant la période postnatale, il a cependant été montré que l'utilisation de corticostéroïdes permet de diminuer le taux de DBP mais est associée à des effets délétères neurologiques (Society 2002). Les corticoïdes comme la bétaméthasone et la dexaméthasone sont des anti-inflammatoires très puissants. Comme le développement de la DBP est en grande partie associé à l'inflammation pulmonaire, l'administration postnatale de corticoïdes semble être tout à fait désignée. Or, certaines études ont montré qu'ils sont associés à un mauvais développement neurologique, ce qui a contribué à diminuer leur utilisation (Society 2002). Plusieurs considèrent néanmoins que, chez les patients les plus à risque de développer une DBP, le bénéfice associé aux corticoïdes dépasse les effets néfastes. Une étude randomisée et contrôlée a d'ailleurs montré que la dexaméthasone délivrée à petites doses (0,89 mg/kg sur 10 jours) permet de diminuer la durée de ventilation sans être associée à un mauvais développement neurologique à l'âge de deux ans (Doyle et al. 2007). Récemment, l'hydrocortisone a aussi montré des résultats très encourageants en montrant que 60 % des patients du groupe expérimental avaient survécu sans développer de DBP contre 51 % chez le groupe placebo ($p = 0.04$). Malheureusement, l'étude a été interrompue à 523 patients (66 % du nombre prévu initialement), dû à des problèmes de financement. Le suivi des patients admis a été effectué à 2 ans et n'a pas montré de différence neurodéveloppementale entre les patients des deux groupes (Baud et al. 2017). Il n'en demeure pas moins que ces résultats ont contribué à alimenter le débat sur l'utilisation des corticoïdes postnataux. Une méta-analyse incluant quatre études randomisées contrôlées (982 patients) suggère que l'administration

d'hydrocortisone à faible dose est associée à un plus faible taux de DBP. Elle a cependant aussi montré une plus grande incidence de perforation intestinale et de sepsis d'apparition tardive (Shaffer et al. 2019).

1.3.6 Cible de saturation artérielle

Tel que décrit dans les sections précédentes, l'oxygène peut contribuer à l'apparition de la DBP. Beaucoup d'études se sont donc concentrées à évaluer quel serait le meilleur intervalle de valeurs cibles à utiliser pour assurer une bonne oxygénation sans contribuer au développement de la DBP. Une méta-analyse faite à partir de 5 études randomisées contrôlées a comparé deux intervalles cibles d'oxygénation artérielle, soit 91-95% et 85-89%. L'intervalle le plus élevé était associé à un risque plus faible de mortalité et d'entéocolite nécrosante, mais à aucune différence sur l'objectif primaire combiné de mort et de retard neurodéveloppemental à 18-24 mois d'âge corrigé (Askie et al. 2018). La cible de 91-95% s'est imposée suite à ces études. En contrepartie, on dénombrait un nombre plus faible de traitement pour la rétinopathie du prématuré chez le groupe avec une plus faible cible de saturation.

1.4 Traitement à long terme de la dysplasie bronchopulmonaire

Bien que l'objectif initial du traitement soit de maintenir la vie tout en limitant les dommages pulmonaires induits par la ventilation, certains patients nécessiteront une ventilation mécanique (invasive ou non-invasive) prolongée durant plusieurs semaines ou mois, suivi d'une oxygénothérapie nasale bien après la période néonatale. Ils auront également besoin de traitements répétés de corticostéroïdes, de bronchodilatateurs et de diurétiques. Les patients les plus sévèrement atteints auront finalement besoin d'une VMI par trachéostomie et d'une gastrostomie. De plus, entre 10-20 % de ces patients vont aussi souffrir d'hypertension artérielle pulmonaire (Lagatta et al. 2018, Steurer et al. 2019). Ces patients sont malheureusement les plus à risque de décès tardif et de comorbidité (Abman et al. 2017).

Il est clair que l'amélioration des soins effectués durant les dernières décennies dans les unités de soins intensifs néonataux a grandement contribué à l'amélioration des taux de

survie des patients nés extrêmement prématurés. **Cependant, le taux de DBP demeure élevé (> 80 %) chez les nouveau-nés à un âge gestationnel inférieur à 25 semaines selon le rapport annuel de 2018 du réseau néonatal canadien (voir annexe-2).** Le besoin d'identifier de nouvelles avenues thérapeutiques est donc élevé (Stoll et al. 2015, Davidson et Berkelhamer 2017).

1.5 Nouvelles thérapies pour prévenir la dysplasie bronchopulmonaire

Vu le maintien d'un taux élevé de DBP, plusieurs nouvelles thérapies ont été suggérées et testées, telles que l'administration topique de corticostéroïdes, de cellules souches mésenchymateuses et d'anti-inflammatoires.

Récemment, on note un intérêt pour l'administration topique intratrachéale de corticoïdes dû à leur activité anti-inflammatoire. Il a été démontré dans des études que le budésonide diminuait l'incidence de la DBP (Bassler et al. 2015, Yeh et al. 2016, Venkataraman et al. 2017, Strueby et Thebaud 2018). Ce dernier ne cause pas d'effets indésirables et est déjà bien établi dans le traitement de maladies inflammatoires comme l'asthme (O'Connell 2002).

L'administration de cellules souches mésenchymateuses a montré des résultats très encourageants chez des modèles animaux, comme la souris et le rat, afin de promouvoir le développement pulmonaire (Aslam et al. 2009, van Haaften et al. 2009, Augustine et al. 2020). Vu les résultats encourageants *in vitro*, une étude de phase 1 a été initiée. Il a été montré que l'administration intratrachéale d'une dose de cellules mésenchymateuses allogéniques dérivées du sang du cordon ombilical était faisable et sans effet indésirable associé à l'instillation (Chang et al. 2014, Powell et Silvestri 2019).

D'autres thérapies à base d'anti-inflammatoires comme l'antagoniste du récepteur d'IL-1 β ou encore la modulation du NLRP3 en amont d'IL-1 β semblent être prometteuses pour limiter l'inflammation et ont montré une efficacité dans des études précliniques (Collins et al. 2017).

Malheureusement, à l'heure actuelle, aucune thérapie envisagée ne semble avoir le potentiel d'éliminer le problème de la DBP chez les extrêmes prématurés.

1.6 Résumé

En conclusion de ce chapitre, il est à préciser que la DBP est, en elle-même, une pathologie très hétérogène résultant d'une sommation de processus physiopathologiques multifactoriels. Les patients atteints présentent de grandes différences interindividuelles au niveau de l'alvéolarisation, de la fibrose pulmonaire et du développement/remodelage vasculaire pulmonaire (Lal et Ambalavanan 2015). Il est difficile d'établir une seule thérapie valable pour tous les individus. L'idéal serait de prévenir les dommages pulmonaires à la source.

En effet, bon nombre des thérapies proposées ne permet pas d'éliminer l'inflammation initiale associée à l'intubation et la VMI. En agissant de façon prophylactique, il serait possible d'empêcher cette première vague d'inflammation et possiblement d'annihiler le développement de la DBP. C'est pourquoi l'équipe du laboratoire INOLIVENT s'est positionnée dans l'utilisation de la VLT pour prévenir la dysplasie bronchopulmonaire *via* son utilisation prophylactique, avant toute aération des poumons.

CHAPITRE 2. VENTILATION LIQUIDIENNE

L'utilisation d'un perfluorocarbone liquide comme transporteur d'oxygène pouvant assurer la respiration a été étudiée pour la première fois en 1966 par Clarks et Gollan. À l'époque, ils avaient démontré qu'une souris pouvait survivre plusieurs minutes dans un perfluorocarbone préoxygéné (Clark et Gollan 1966). On parla alors pour la première fois de ventilation liquidienne (VL) et cette découverte a ouvert la voie à plusieurs études sur le sujet. Les études se sont divisées en deux catégories distinctes, soit la ventilation liquidienne partielle (VLP) et la ventilation liquidienne totale (VLT) dont il sera question dans cette section. Il sera question de l'historique de la VL, ses caractéristiques, ses utilisations et son potentiel pour la prévention de la DBP.

2.1 Ventilation liquidienne partielle

Ce type de VL consiste à instiller du PFC dans les poumons jusqu'à l'obtention de l'équivalent de la CRF en liquide caractérisée par la présence d'un ménisque à l'extrémité de la sonde endotrachéale en fin d'expiration (autour de 25-30 ml/kg) (Overfield et al. 2001, Luecke et al. 2003). La VLP requiert l'utilisation d'un ventilateur conventionnel pour assurer le V_T gazeux (Fujino et al. 1999). Les régions dépendantes (les plus déclives) ont tendance à se remplir de PFC alors que les zones non dépendantes restent remplies d'air. Ceci provoque une hétérogénéité de ventilation des poumons en fonction de la gravité. Il a été démontré qu'une instillation de 10 ml/kg de bromure de perfluorooctyle (PFOB – Perflubron®) était suffisante pour augmenter de manière draconienne la densité du poumon dans les régions dépendantes. Ceci a été mesuré par cytodensitométrie chez un modèle ovin de détresse respiratoire aiguë induit par émulsion d'acide oléique (Luecke et al. 2003). L'effet était encore plus marqué avec une instillation de 30 ml/kg alors que dans les régions non dépendantes l'augmentation était plus subtile. La VLP a été utilisée comme traitement dans les cas de détresse respiratoire aiguë pour aider à maintenir les voies aériennes ouvertes chez le nouveau-né et chez l'adulte avec des résultats très prometteurs sur l'oxygénation et la mécanique respiratoire (Leach et al. 1995). On note aussi un meilleur rapport ventilation/perfusion (V/Q) en VLP qui serait associé à la présence du PFC dense dans les

régions dépendantes forçant la redistribution sanguine vers les zones non dépendantes où le V_T gazeux se distribue majoritairement (Lowe et Shaffer 1986).

La VLP est plus simple à appliquer que la VLT puisqu'elle requiert seulement l'instillation de PFC et l'utilisation d'un ventilateur conventionnel. Elle a ainsi été beaucoup plus étudiée que la VLT. Des études ont notamment été réalisées pour évaluer quel volume de remplissage pulmonaire était optimal, bien que les résultats demeurent à ce jour controversés (Wolfson et Shaffer 2004). Cependant, une vaste étude clinique n'a pas pu montrer un réel bénéfice de l'utilisation de la VLP dans la prise en charge de patients adultes souffrant de détresse respiratoire aigüe, forçant l'arrêt de l'étude (Galvin et al. 2013). Cette étude a énormément nuit à la visibilité et au développement de la VL sous toutes ses formes; dès lors, les recherches sur la VL ont presque été abandonnées.

2.2 Ventilation liquidienne totale

La ventilation liquidienne totale consiste à utiliser un liquide de la famille des PFC comme vecteur d'échange gazeux plutôt qu'un mélange gazeux, et ce, sur un poumon préalablement rempli du même liquide (Tooley et al. 1996). Pour ce faire, un appareil dédié doit être utilisé pour assurer un V_T liquidien afin de permettre d'introduire du PFC oxygéné et en retirer le PFC riche en CO_2 à l'expiration. Avec des poumons complètement remplis et l'ajout d'un V_T de PFC, un poumon soumis à la VLT va être recruté⁶ de façon beaucoup plus homogène qu'un poumon sous VLP (Hirschl et al. 1994, Tooley et al. 1996). Une interface liquide-liquide dans les alvéoles est ainsi présente dans tout le poumon à tout moment du cycle respiratoire. Les effets bénéfiques du PFC sur la mécanique respiratoire et sur l'inflammation (seront présentés dans la *section 2.4*) sont alors mis à profit dans la totalité du poumon. Malgré les bienfaits connus de la VLT et l'espoir placé en elle, son utilisation a toujours été limitée par l'absence d'un ventilateur liquidien homologué pour la clinique. Néanmoins, plusieurs études chez des modèles animaux ont été effectuées pour évaluer le potentiel de la VLT pour différentes entités cliniques.

⁶ Poumon recruté : Poumons dont les alvéoles sont maintenues ouvertes

2.3 Famille des perfluorocarbones

Découverts lors du projet Manhattan (1939 – 1946), tristement célèbre pour l'invention de la bombe atomique, les PFC sont depuis utilisés pour la VL grâce à leurs propriétés physicochimiques. La molécule de PFC est un squelette de carbones formant des liaisons covalentes avec des atomes de fluor. Cette disposition moléculaire très stable permet de solubiliser les gaz dans ses espaces intra-atomiques par gradient de pression (Riess 2005). Cela permet la dissolution de près de 15 fois plus d'oxygène que dans le sérum physiologique à pareille température (tableau 1). De plus, les PFC ont une très faible tension de surface, ce qui leur permet d'agir comme un surfactant lorsqu'introduit dans les poumons. Ils permettent, en effet, de réduire la tension de surface alvéolaire, ce qui contribue à l'amélioration de la compliance pulmonaire et à la possibilité d'utiliser une pression inspiratoire plus faible pour assurer le V_T (Wolfson et Shaffer 2005).

2.3.1 Caractéristiques des différents perfluorocarbones

Plusieurs PFC ont été utilisés pour la VL avec quelques différences dans leurs structures moléculaires. Le perfluorodécalin (PFDEC) et le PFOB ont été principalement utilisés en raison de leur certification « qualité médicale » et de leur disponibilité commerciale. Le tableau 1 présente leurs caractéristiques physico-chimiques. À la lumière des propriétés de chacun, le PFOB semble un candidat à prioriser comme il permet de solubiliser davantage d'O₂ et de CO₂ que le PFDEC. Sa plus faible viscosité favorise son introduction et son retrait dans les poumons. Il est cependant plus tensio-actif que le PFDEC, avec une tension de surface de 18 dyn/cm plutôt que de 15 dyn/cm, respectivement. Cette différence semble toutefois cliniquement négligeable, comparativement au sérum physiologique qui a une tension de surface beaucoup plus élevée à 72 dyn/cm (Wolfson et Shaffer 2004). Par ailleurs, le PFOB peut être détecté par imagerie aux rayons X grâce à la présence d'un atome de brome lui conférant une radio-opacité. Cela lui a permis d'être aussi utilisé comme agent de contraste en imagerie médicale (Wolfson et al. 1994). De plus, il est possible d'obtenir commercialement du PFOB pur à 99.9 % alors que c'est, pour le moment, impossible avec le PFDEC. L'ensemble de ces propriétés font du PFOB le PFC de choix pour la VLT. C'est pourquoi il a été sélectionné pour les travaux effectués dans cette thèse.

Tableau 1. Caractéristiques des deux PFC ayant une certification « qualité médicale »
Adapté de (Wolfson et Shaffer 2004) et de (Jackson et al. 1994).

CARACTÉRISTIQUES	SÉRUM	PFDEC	PFOB
	PHYSIOLOGIQUE	C ₁₀ F ₁₈	C ₈ F ₁₇ Br
Solubilité de l'O ₂ (ml/100 ml, 37°C)	3	49	53
Solubilité du CO ₂ (ml/100 ml, 37°C)	57	140	210
Densité (g/ml, 25°C)	1,00	1,95	1,93
Viscosité (Cs, 25°C)	1,00	2.61	1,00
Pression de vapeur (mm Hg, 37°C)	47	6,25	5,20
Tension de surface (dyn/cm, 25°C)	72	15	18

2.3.2 Propriétés biochimiques du PFOB

Bien qu'il ait été administré de façon intratrachéale, intraveineuse (Spahn 1999) et intraoculaire (Banker et al. 1996), le PFOB n'a jamais montré un quelconque effet secondaire pouvant lui être associé (Weers 1993). On le décrit donc comme un liquide biochimiquement inerte malgré une persistance notable dans l'organisme. Il a été démontré, suivant une VLP de quelques heures chez des chiens, qu'on pouvait déceler des traces de PFOB dix ans après son administration (Hood et Modell 2000). Principalement éliminé par évaporation lors de l'expiration, le PFOB résiduel serait aussi capté par le système réticulo-endothélial pulmonaire formé par les macrophages et les monocytes (Remy et al. 1999). Aucun risque pour l'organisme n'a donc été mis en évidence à ce jour.

2.4 Applications de la ventilation liquidienne

Depuis les premiers essais en VL dans les années 1960, plusieurs applications potentielles ont été étudiées. Quelques études ont été faites chez l'humain mais la majorité d'entre-elles ont utilisé des modèles animaux. Dans la section suivante, il sera question des multiples applications de la VL (partielle et totale) telles que le traitement de détresse respiratoire aiguë, l'hypothermie thérapeutique, le lavage pulmonaire thérapeutique, l'administration de médicaments, la promotion de la croissance et le développement

pulmonaire et finalement la cytoprotection. Dans cette section, il sera question des applications autant pour la VLP que la VLT car bon nombre d'avantages associés aux techniques viennent de l'utilisation des PFC et de leurs propriétés.

2.4.1 Traitement du syndrome de détresse respiratoire aiguë

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), à ne pas confondre avec la détresse respiratoire du prématuré qui elle touche seulement les nouveau-nés, est une pathologie très grave qui met la vie du patient à risque. Elle se caractérise par une oxygénation déficiente et un œdème pulmonaire lésionnel associée à un effondrement de la compliance pulmonaire. Il est ainsi extrêmement difficile d'assurer une ventilation adéquate chez ces patients (Diamond et al. 2020). En lien avec les propriétés anti-inflammatoires et anti-atélectasiques associées à la VL, plusieurs études ont évalué la possibilité d'utiliser la VL dans le traitement des détresses respiratoires dans un contexte néonatal et adulte (Leach et al. 1995, Hirschl et al. 1996). Dans tous les cas, il a été noté une diminution marquée des dommages pulmonaires et du shunt intrapulmonaire et une amélioration de la compliance et de l'oxygénation. Or, d'autres études plus récentes ont cependant obtenu des résultats beaucoup plus mitigés. Pour ce qui est de la VLP, les résultats n'ont pas été aussi bons qu'envisagés alors que Kacmarek et al. ont évalué son efficacité chez des adultes avec SDRA et ont conclu qu'il y avait plus de risque de pneumothorax, d'épisodes hypoxiques et hypotensifs. Les auteurs ont ainsi émis un sérieux doute quant à l'efficacité et la sécurité de la VL dans le traitement de SDRA (Kacmarek et al. 2006). Une revue Cochrane réalisée en 2013 a aussi déterminé que l'utilisation de la VLP chez des patients avec SDRA était davantage associée à des effets négatifs que positifs et que son utilisation n'était pas recommandée (Galvin et al. 2013).

Toutes ces études ont été réalisées en VLP alors que cette dernière n'a pas tous les avantages de la VLT en terme de recrutement pulmonaire plus homogène et une meilleure distribution du volume pulmonaire (Hirschl et al. 1994, Tooley et al. 1996). Dans un modèle de SDRA induit par injection d'acide oléique chez le mouton adulte (53 ± 4 kg), Pohlmann et al. ont déterminé que la VLT permet une meilleure prise en charge respiratoire que la VMI conventionnelle. Ils ont en effet obtenu de meilleurs gaz du sang que le groupe VMI

(Pohlmann et al. 2011). Chez le lapin adulte, l'équipe du Pr Tissier a, de son côté, comparé la prise en charge de SDRA induit par injection intratrachéale d'acide chlorhydrique par la VLT hypothermisante (voir *section 2.4.2*) et la VMI conventionnelle. Les résultats ont montré que l'utilisation de la VLT avec hypothermie permettait de réduire l'inflammation pulmonaire et de maintenir la pression artérielle systémique en comparaison avec le groupe en VMI conventionnelle (Rambaud et al. 2018). L'utilisation de la VLT représente certainement un intérêt dans la prise en charge du SDRA, mais beaucoup d'études devront encore être réalisées pour évaluer son efficacité réelle.

2.4.2 Induction ultrarapide d'hypothermie thérapeutique

Une autre application de la VL est l'induction ultrarapide de l'hypothermie thérapeutique après un arrêt cardiaque chez l'adulte. Les poumons agissent comme un excellent échangeur de chaleur (Nadeau et al. 2014). L'administration de PFC préalablement refroidi permet d'induire une hypothermie thérapeutique en environ 5 minutes (Nadeau et al. 2014). L'utilisation de l'hypothermie thérapeutique vise principalement à réduire le syndrome post-arrêt cardiaque responsable des effets délétères cérébraux et cardiaques (Tissier et al. 2007, Giuliani et al. 2016). Un des enjeux clefs de cette technique est d'arriver à induire très rapidement l'hypothermie puisque la fenêtre d'efficacité se situe principalement dans les 30 premières minutes post-arrêt cardiaque (Kohlhauer et al. 2015). Les techniques actuellement utilisées, comme le refroidissement transcutané, sont très lentes à mettre en place. De plus, elles ne permettent pas un contrôle efficace de la température corporelle et peuvent entraîner une hypothermie trop importante (sous les 32 °C), associée à de l'arythmie cardiaque potentiellement létale (Salinas et al. 2015). La VLT permet une induction rapide et très précise de l'hypothermie thérapeutique (Tissier et al. 2009, Hutin et al. 2015, Kohlhauer et al. 2015).

D'un point de vue physiologique, l'hypothermie permet de réduire la cascade apoptotique qui survient lorsque les neurones sont privés d'oxygène pour une certaine période, ce qui contribue à prévenir les séquelles neurologiques (Kohlhauer et al. 2015). Il a été démontré que l'hypothermie thérapeutique induite ultra-rapidement permet de diminuer la taille des infarctus cardiaques chez un modèle de lapin adulte (Tissier et al. 2009). Il a

aussi été montré, chez un modèle d'agneau juvénile, qu'il n'y avait aucun impact négatif mesurable associé à l'administration de PFC froid dans les poumons (Sage et al. 2016).

2.4.3 Lavage pulmonaire thérapeutique

L'utilisation d'un V_T liquidien permet de retirer les débris endogènes et exogènes des poumons (Wolfson et Shaffer 2005). En effet, l'équipe INOLIVENT a montré que la VLT permet de retirer davantage de méconium des poumons en comparaison avec un lavage bronchopulmonaire avec du surfactant dilué chez un modèle ovin de syndrome d'aspiration méconiale (Avoine et al. 2011). De plus, l'utilisation du PFC permet de prévenir l'atélectasie et l'infiltration leucocytaire (Hirschl et al. 1995). Ainsi, la VLT présente de nombreux avantages pour traiter des patients avec des détresses respiratoires induites par une aspiration méconiale, ou encore les patients atteints de protéinose alvéolaire. Cela dit, de plus amples études doivent être réalisées afin de valider la méthode avant son arrivée en clinique.

2.4.4 Administration de médicaments

L'efficacité thérapeutique des médicaments dépend en partie de leur voie d'administration. Chaque voie pose des défis. Par exemple, l'administration de médicaments par voie orale est limitée par l'acidité de l'estomac, l'absorption par les intestins et le phénomène de premier passage hépatique avant que la molécule d'intérêt ne se retrouve dans la circulation systémique où elle doit agir. Ainsi, en passant par les poumons, il est possible de bénéficier d'une surface d'échange très importante (entre 70 et 140 m²) sans passer par le système digestif pouvant affecter l'intégrité de la molécule d'intérêt (Patil et Sarasija 2012). Cela permet au médicament d'entrer facilement dans la circulation sanguine systémique. Plusieurs méthodes existent pour utiliser cette voie d'administration, par exemple, les aérosols-doseurs et l'instillation directe de liquide dans les voies aériennes. Bien qu'efficaces en partie, ces méthodes ne permettent pas d'obtenir une distribution homogène du produit dans les poumons.

L'utilisation de l'aérosol-doseur est coûteuse. De plus, la distribution du médicament est influencée par la taille des particules administrées et elle est très limitée dans les régions

pulmonaires périphériques (Lizio et al. 2000, Chono et al. 2006). C'est pourquoi d'autres méthodes en utilisant un perfluorocarbonate comme vecteur de transport ont été proposées.

Les PFC ont été utilisés pour l'administration endotrachéale de médicaments comme des agents vasodilatateurs (tolazoline, oxyde nitrique), des antibiotiques (gentamycine) et même des agents analgésiques (desflurane, sevoflurane) (Wolfson et al. 1996, Dickson et al. 2002, Cabrales et al. 2007). Bien que les PFC ne soient que très peu, voire pas du tout, miscibles avec la majorité des composés pharmaceutiques, il a tout de même été démontré que le fait d'agiter le liquide permettait de maintenir en suspension les composés pour les administrer adéquatement (Wolfson et al. 1996). De nouvelles méthodes sont cependant étudiées pour améliorer la solubilité des composés par l'ajout de composés fluorés, rendant la molécule miscible avec le PFOB riche en fluor, ou encore par l'utilisation de nanocristaux. Cette dernière approche a d'ailleurs permis de démontrer qu'il est plus efficace d'administrer de la gentamycine directement dans les poumons plutôt qu'en intraveineux chez un modèle animal néonatal (Cullen et al. 1999).

2.4.5 Croissance et développement pulmonaire

Les patients atteints d'hernie diaphragmatique congénitale peuvent présenter une hypoplasie pulmonaire. L'absence partielle ou totale (seulement 11 cas rapportés dans la littérature dans une revue en 2017) de diaphragme rend possible la migration des intestins ou encore de l'estomac dans la cavité thoracique, empêchant la croissance pulmonaire (Al-Adnani et Marnerides 2017, Chandrasekharan et al. 2017). L'hypoplasie pulmonaire qui en résulte se présente à la naissance par une détresse respiratoire (plus sévère chez les patients affectés du côté droit) et une hypertension artérielle pulmonaire fixe (c'est-à-dire qui répond peu aux traitements vasodilatateurs) reliée à une hypoplasie des vaisseaux pulmonaires. La ventilation mécanique nécessaire pour assurer les échanges gazeux est souvent difficile et peut engendrer le VILI. Dans bien des cas, cette pathologie est associée à un sombre pronostic et peu de traitements sont disponibles.

Chez des agneaux avec hernie diaphragmatique induite (avant la chirurgie correctrice), Major et al. ont montré que la VLP permet d'améliorer significativement la

compliance pulmonaire et ainsi réduire le VILI normalement associé à la ventilation mécanique (Major et al. 1997).

Plus récemment, Herber-Jonat et al. ont montré, chez un modèle de lapin foetal avec hernie diaphragmatique, que l'instillation de PFC permet d'améliorer la croissance pulmonaire, la mécanique pulmonaire et stimule la synthèse de la matrice extracellulaire. Ils ont aussi montré que le PFC augmente l'expression de la métalloprotéase-2, importante dans le processus d'alvéolarisation. De plus, la présence du PFC n'altérerait pas la production du surfactant pulmonaire (Herber-Jonat et al. 2014).

2.4.6 Cytoprotection

Depuis plusieurs années, les PFC sont associés à une activité anti-inflammatoire. Il a ainsi été montré que la présence de PFC dans les poumons permet d'obtenir une cytoprotection notamment par une diminution de la leucostase et de l'adhésion cellulaire et une plus faible expression des cytokines pro-inflammatoires (Thomassen et al. 1997, Rotta et Steinhorn 1998, Woods et al. 2000). D'autres études ont aussi montré une diminution de l'activation des granulocytes. L'activation des granulocytes est responsable d'induire un stress oxydatif qui contribue à l'oxydation des protéines et lipides intrapulmonaires (Smith et al. 1995). Cela dit, les mécanismes moléculaires de signalisation intracellulaire ainsi que les facteurs de transcription impliqués ne sont toujours pas identifiés.

2.5 Prévention de la dysplasie bronchopulmonaire

Afin de bien comprendre comment la VLT pourrait prévenir la DBP, il faut revenir à la physiopathologie de cette dernière. En résumé, les patients qui naissent extrêmement prématurés n'ont pas de système pulmonaire leur permettant de respirer à l'air libre. Le faible développement pulmonaire associé à la carence en surfactant mène au besoin d'instaurer une ventilation mécanique pour assurer les échanges gazeux, mais aux dépens de dommages pulmonaires. Le développement de la DBP est en partie lié à ces dommages. Le développement de la DBP peut donc être une conséquence en lien avec l'initiation de la ventilation mécanique dès la naissance. L'instauration d'une VLT de façon prophylactique dès la naissance pourrait empêcher le développement de la MMH. Le PFOB a un effet

similaire au surfactant et peut permettre de pallier le manque de surfactant endogène chez les extrêmes prématurés et permettre une ventilation moins agressive. De plus, comme il a été montré précédemment chez un modèle ovin de syndrome d'aspiration méconiale, la VLT permet de retirer les débris cellulaires de l'intérieur des poumons (Avoine et al. 2011). Ainsi, en plus de maintenir une faible tension de surface et les alvéoles ouvertes, la VLT permet de laver les molécules inflammatoires qui s'accumulent normalement lors de la MMH. Avec la VLT prophylactique, il serait aussi possible de stimuler la relâche de surfactant endogène et la croissance pulmonaire (Shaffer et al. 1983, Herber-Jonat et al. 2014). Après une période de quelques heures à quelques jours, il serait possible d'arrêter la VLT en passant ainsi en VLP. Le PFC résiduel pourrait continuer d'agir comme un surfactant le temps que le surfactant endogène soit sécrété, ce qui pourrait permettre la ventilation spontanée (Hirschl et al. 1995, Hirschl et al. 1996, Leach et al. 1996).

Pour ce qui est de la VLP, Leach et al. ont réalisé une étude chez 13 enfants prématurés de 24-34 semaines d'AG souffrant de MMH. Les patients inclus ne répondaient pas au surfactant et leur pronostic vital était donc fortement engagé. Dix des treize enfants soumis à la VLP ont survécu. Les auteurs concluent que l'utilisation de la VLP a permis de sauver ces patients d'une mort certaine (Leach et al. 1996). Cela dit, l'absence de groupe contrôle dans leur étude limite beaucoup les conclusions réelles qu'on peut en tirer.

Plusieurs études ont été faites chez des modèles animaux avec des détresses respiratoires de causes variées (aspiration méconiale, injection d'acide oléique et déficit en surfactant) et ont conclu que la VLP permettait d'améliorer la compliance pulmonaire et les échanges gazeux (Major et al. 1997, Chappell et al. 2001, Lewis et al. 2001, Zhu et al. 2010). Des effets délétères comme des perfluoro-thorax ont cependant été observés dans certaines études. De plus, la VLP est moins bénéfique que la VLT car elle ne permet pas d'éviter l'utilisation d'une VG pouvant être délétère, surtout dans un contexte d'un poumon malade, très hétérogène en termes de recrutement alvéolaire.

Pour ce qui est de la VLT, une étude a été réalisée en 1989 chez des enfants souffrant de MMH avec un pronostic très sombre à court terme. Lors de l'initiation de la VLT, une

amélioration de la compliance pulmonaire et des échanges gazeux a été documentée. Malheureusement, dans ce contexte de soins de compassion, tous les patients sont décédés des complications associées à leur grande prématurité (Greenspan et al. 1990). Il est important de préciser que la technique de VLT utilisée consistait à introduire du PFC préoxygéné via un tube endotrachéal relié à un réservoir de PFC placé en hauteur. Il était impossible de contrôler avec précision les pressions administrées dans les voies aériennes. À titre indicatif, une hauteur de 20 cm H₂O du réservoir de PFC représente une pression de presque 40 cm H₂O (le PFC étant 1.93 fois plus dense que l'eau). Cette pression est directement transmise aux alvéoles à la fin de l'inspiration, ce qui est largement suffisant pour créer des lésions pulmonaires chez des nouveau-nés. Cette étude a tout de même montré le bénéfice à court terme de la VLT.

En termes de recherche préclinique, Shaffer et al. ont ventilé 8 agneaux prématurés de 134 jours de gestation (terme = 147 ± 3 jours) en VLT durant 45 minutes. Sur les 8 agneaux, 7 ont survécu à la procédure avec une amélioration de leur compliance dynamique et des échanges gazeux. La technologie de VLT n'était pas aussi avancée à cette époque (1983) que maintenant mais les résultats ont tout de même constitué une première preuve de concept chez un modèle prématuré (Shaffer et al. 1983).

Plus récemment, Bagnoli et al. ont montré, en 2006, qu'il était possible de ventiler des agneaux prématurés ($n = 11$) âgés de 110 ± 5 jours de façon prophylactique pendant 6 heures. Les agneaux étaient nés par césarienne et la ventilation a été initiée alors que les agneaux étaient sous circulation placentaire durant les 10 premières minutes avant le clampage du cordon ombilical. Ils ont comparé les résultats gazométriques obtenus en VLT avec un groupe soumis à une VG ($n = 6$). Dans les deux groupes, les agneaux ont maintenu des PaO₂ adéquates [entre 70-90 mm Hg] et une hypercapnie avec des PaCO₂ entre 65 et 80 mm Hg. Un taux de mortalité de 45% vs 67% a été obtenu chez les groupes VLT et VG respectivement. L'aspect majeur à en retirer demeure le fait qu'il y avait très peu de signes d'inflammation pulmonaire lors de l'analyse histologique des agneaux VLT. Cette étude a donc mis en lumière la possibilité d'initier une VLT de façon prophylactique et de la maintenir durant 6 heures chez des agneaux extrêmement prématurés avec une gazométrie

adéquate sans induire d'inflammation pulmonaire majeure. Malheureusement, ces résultats ont seulement fait l'objet d'une communication dans un congrès et n'ont pas été publiés; il aurait été intéressant d'en savoir plus sur les modalités de VLT et la méthodologie utilisée (Monaco et al. 2006).

Dans cette thèse, il a été déterminé de mettre en place un modèle de déficit en surfactant afin de se rapprocher de la physiopathologie des extrêmes prématurés. Ce projet a permis de montrer, une fois de plus, la faisabilité de maintenir des échanges gazeux dans un contexte de déficit en surfactant (Sage et al. 2018). Ce sujet est approfondi dans l'article 1 présenté au chapitre 5.

2.6 Résumé

La VLT présente un intérêt certain pour prendre en charge les patients atteints de MMH afin de réduire l'inflammation, améliorer la compliance pulmonaire et éviter d'induire du VILI. **Il est donc permis d'espérer que l'utilisation prophylactique de la VLT chez les patients extrêmement prématurés puisse permettre de réduire le développement de la DBP.**

CHAPITRE 3. INOLIVENT

Ce chapitre abordera l'histoire de la ventilation liquidienne à l'Université de Sherbrooke et décrira le prototype de respirateur liquidien (INOLIVENT-6) de même que le déroulement d'une VLT.

3.1 INOLIVENT-6

C'est avec le mandat de créer un respirateur liquidien sécuritaire que l'équipe de recherche en ventilation liquidienne totale de l'Université de Sherbrooke s'est lancée il y a plus de quinze ans dans son élaboration. Elle est parvenue à mettre au point un prototype de respirateur liquidien nommé INOLIVENT, pour Innovative Liquid Ventilation. Au cours des années, les prototypes se sont succédés, devenant de plus en plus efficaces et sécuritaires. Le prototype INOLIVENT-6 a été décrit comme étant le plus avancé mondialement au 7^e symposium de ventilation liquide en 2012 à Paris (voir figure 5). Il a récemment été surpassé par INOLIVENT-7, un prototype conçu pour la recherche sur l'hypothermie thérapeutique chez des modèles adultes (Kohlhauer et al. 2019). Un nouveau prototype, INOLIVENT-8, dédié exclusivement aux ovins prématurés, est en cours de développement.



Figure 5. Évolution des prototypes INOLIVENT.

3.1.1 Description du prototype

Le respirateur liquidien INOLIVENT-6 consiste en un système de deux pompes qui assurent le V_T , d'un oxygénateur à bulles, d'un condensateur de PFC qui permet d'éviter en partie les pertes et d'un ordinateur intégré qui permet de gérer des algorithmes de ventilation, également développés localement (figure 6).

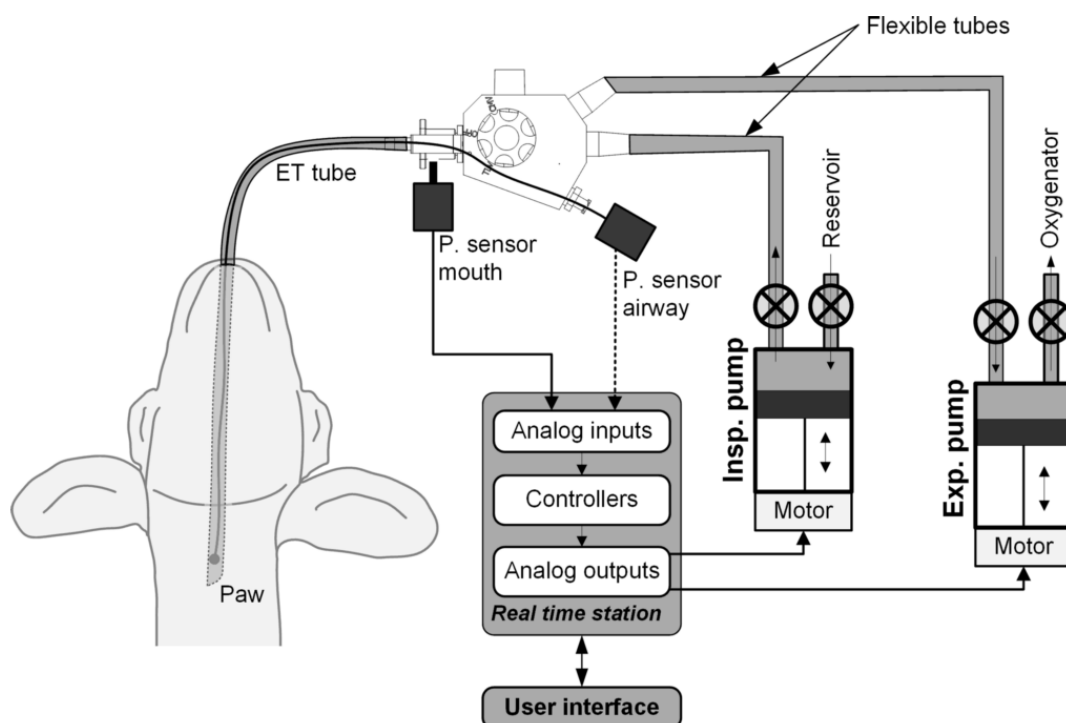


Figure 6. Schéma du ventilateur liquidien INOLIVENT-6.

La pompe inspiratoire administre le V_T de PFOB (Insp. Pump) dans les poumons. La pompe expiratoire (Exp. Pump) retire le V_T des poumons. Un capteur de pression positionné à l'extrémité proximale du tube endotrachéal au niveau du connecteur en « Y » (P. sensor mouth) permet de mesurer et de limiter les pressions administrées. Le capteur introduit dans le tube endotrachéal (P. sensor airway) est optionnel. Figure tirée de Sage et al, 2018 (Sage et al. 2018), contenu en libre accès de *PLOS ONE*.

3.1.2 Réglage des paramètres ventilatoires

Au fil des années, les paramètres de ventilation ont beaucoup évolué et ont été optimisés pour le modèle agneau néonatal. Comme en VMI gazeuse, une attention doit être apportée à chaque détail afin d'obtenir une ventilation optimale sans effet dommageable sur l'intégrité pulmonaire. L'opérateur doit fixer différents paramètres de ventilation : un volume de remplissage, généralement de 20 ml/kg, un V_T de 10 à 20 ml/kg, un temps inspiratoire (T_i) de 2 à 3 secondes, une FR entre 5 et 10 respirations/minute et la température du PFC (T°_{PFC}) inspiré à 39°C. L'un des paramètres essentiels à la bonne conduite d'une VLT demeure le volume liquidien de fin d'expiration (EELV), c'est-à-dire la quantité de PFC restant dans les poumons à la fin de l'expiration. L'EELV doit être maintenu dans un intervalle optimal pour 1) prévenir les collapsus expiratoires de la trachée par un volume trop

faible et 2) éviter la surdistension lors de l'inspiration (Sage et al. 2018). Ceci sera abordé plus en profondeur dans la section suivante.

3.1.3 Collapsus expiratoire en VLT

Lors de l'expiration en VLT, la pompe expiratoire s'abaisse et crée une pression négative dans le circuit expiratoire et conséquemment dans les voies aériennes. Lors d'une expiration normale (sans collapsus), la pression minimale mesurée au connecteur en Y est d'environ - 20 cmH₂O (pression de pause de fin d'expiration entre -1 cmH₂O et -2 cmH₂O) selon le débit expiratoire utilisé. Le débit expiratoire est dépendant de la FR, du T_i et du V_T. Plus la FR, le T_i et le V_T sont élevés, plus le débit expiratoire devra être grand pour permettre le retrait du V_T expiratoire dans le temps alloué. S'il ne reste plus assez de PFC dans les poumons dû à un faible EELV ou encore que le débit expiratoire est trop important, il peut arriver que la pression devienne beaucoup plus négative (inférieure à - 50 cmH₂O), (figure 7). Ceci peut provoquer la fermeture de la trachée qui s'écrase alors sur elle-même et empêche la sortie du liquide. Ce phénomène associé à la VLT est appelé collapsus expiratoire. Le collapsus expiratoire implique que le V_T expiratoire visé n'est pas atteint et qu'une partie du liquide reste dans les poumons. Ceci nuit considérablement aux échanges gazeux puisque le liquide qui n'a pas été retiré ne sera conséquemment pas réoxygéné. De plus, l'arrêt prématuré du cycle doit alors être pallié par l'appareil qui va introduire moins de PFC lors de l'inspiration suivante afin d'éviter d'augmenter le volume pulmonaire total. Lorsque le collapsus se répète à chaque cycle, il devient extrêmement difficile de maintenir la ventilation minute (V_{min}) nécessaire au maintien des échanges gazeux (V_{min} ≈ 140 ml/kg/min à FR de 10/min et V_{min} ≈ 100 ml/kg/min à FR de 5/min) (*section 5.3*). Plus le modèle est immature (nouveau-né, prématuré), plus la trachée est molle et a tendance à se collaber (Costantino et al. 2004). Chez des modèles adultes, le collapsus est beaucoup moins observé alors que la trachée, plus rigide, supporte des pressions négatives plus importantes avant de se collaber (Sage et al. 2016). Ceci fait donc partie des défis d'utiliser la VLT chez des modèles comme les extrêmes prématurés. De plus, bien que Bagnoli et al., n'aient pas montré d'impact délétère sur l'intégrité de la trachée suivant des collapsus expiratoires (Bagnoli et al. 2007), l'absence d'effet délétère de collapsus expiratoires répétés sur des modèles aussi fragiles que les extrêmes prématurés reste tout de même à démontrer. Dans

une étude effectuée par l'équipe INOLIVENT, des dommages macroscopiques ont été observés dans la trachée des agneaux à terme suivant une VLT de 5 heures (données non publiées). C'est pourquoi les collapsus expiratoires ont été très étudiés dans le laboratoire INOLIVENT afin de 1) mieux les comprendre et 2) développer un algorithme de gestion du collapsus expiratoire.

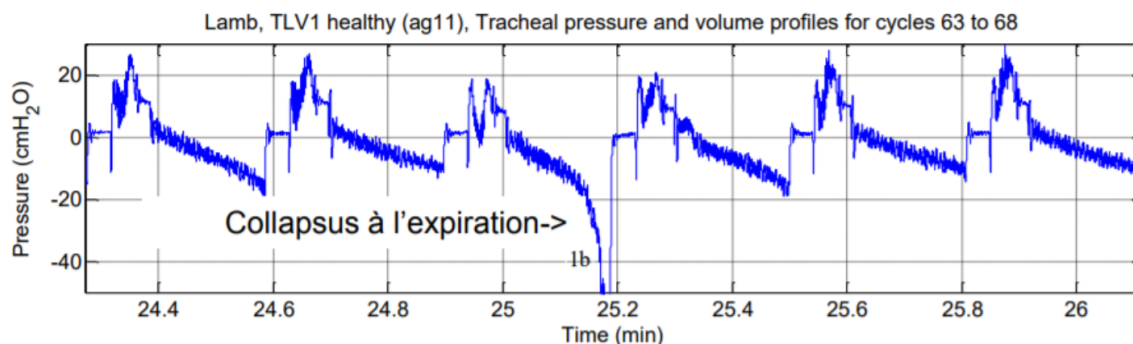


Figure 7. Signal de pression mesurée au connecteur en Y lors d'une VLT. Figure tirée de : R. Robert, « Modélisation numérique et stratégies de commande du débit expiratoire pour éviter le collapsus des voies respiratoires en ventilation liquidienne totale », Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, 2007 (Robert 2007).

3.1.4 Algorithme de gestion des collapsus expiratoires.

Dans l'optique de détecter et prévenir les collapsus expiratoires, un algorithme de gestion a été implémenté dans INOLIVENT-6. Cet algorithme va détecter la diminution de la pression expiratoire au connecteur en Y. Lorsqu'elle atteint un certain seuil fixé par l'utilisateur, l'algorithme va diminuer les débits expiratoires afin d'éviter la fermeture complète de la trachée. Il a ainsi été démontré que la diminution du débit expiratoire devait être très rapide afin de maintenir l'ouverture de la trachée (Jolli 2020). Cela permet de retirer davantage de PFOB malgré le collapsus expiratoire. L'algorithme est donc très utile pour ventiler avec un EELV minimale tout en évitant les collapsus. Il faut tout de même rester prudent, car bien que très efficace, l'algorithme de gestion des collapsus expiratoires va affecter la ventilation minute. En effet, en diminuant le débit expiratoire, l'appareil doit laisser plus de temps à l'expiration pour retirer le même V_T . À ce moment, l'opérateur doit prendre la décision d'augmenter le EELV s'il ne veut pas affecter la ventilation minute. Avec un plus grand volume de PFC intra-pulmonaire au début de l'expiration, il est plus facile d'en retirer davantage sans déclencher de collapsus expiratoires. Les recherches sur le

collapsus expiratoire ont beaucoup progressé dans les dernières années alors qu'on sait maintenant comment il se produit dans des modèles *in vitro*. Il reste, néanmoins, beaucoup d'études à faire pour bien comprendre et modéliser les collapsus expiratoires chez des modèles *in vivo*. Le rôle de la pression intrapleurale sur la trachée avec un liquide dense comme le PFC dans les poumons devra être pris en compte. L'impact de la pression intrapleurale comprimant la trachée lors de l'expiration n'est toujours pas connu. Cela dit, l'algorithme de gestion des collapsus expiratoires, tel qu'implanté dans INOLIVENT-6, a permis de repousser les limites des FR pouvant être atteintes par le respirateur de sorte qu'il est maintenant possible d'utiliser des FR de 10/min, alors que traditionnellement la VLT utilisait des FR d'environ 5/min (Wolfson et Shaffer 2005).

3.1.5 Résumé

L'équipe du laboratoire INOLIVENT de Sherbrooke se positionne depuis plusieurs années comme chef de file en matière de VLT à l'international. L'équipe compte de nombreuses publications et brevets sur le domaine dans les dernières années. Avec le développement d'INOLIVENT-8 quasiment complété, il sera intéressant de suivre les avancées qui seront effectuées afin de permettre la mise en place du ventilateur le plus adapté à la ventilation des agneaux extrêmement prématurés.

CHAPITRE 4. CONTEXTE DU PROGRAMME DOCTORAL

Bien qu'à ce jour la VLT semble prometteuse pour la prévention de la DBP, plusieurs questions restent en suspens et devront être posées avant de pouvoir amener cette technique en clinique de façon sécuritaire. Ces interrogations ont été à l'origine des travaux de doctorat présentés dans cette thèse. Ainsi, il sera question des impacts hémodynamiques associés à la VLT, de la distribution des volumes pulmonaires de PFOB et des paramètres ventilatoires optimaux pour limiter la réponse inflammatoire pulmonaire. Finalement, comme très peu de données sont disponibles dans la littérature en ce qui a trait au retour à la respiration spontanée après une VLT, le sujet a aussi été étudié.

4.1 Impact de la ventilation liquidienne totale sur le retour veineux et les paramètres hémodynamiques.

La tolérance hémodynamique à la VLT a été, à maintes reprises, étudiée avec des résultats mitigés. Comme celle-ci dépend probablement des algorithmes de ventilation spécifiques, il était important de s'assurer de la bonne tolérance hémodynamique des agneaux sous VLT avec l'utilisation du ventilateur INOLIVENT-6 et une bonne gestion du EELV.

En respiration spontanée, le diaphragme s'abaisse lors de l'inspiration et crée une pression négative dans le thorax. Ceci permet à l'air d'être aspiré dans les voies aériennes jusqu'aux alvéoles afin d'assurer les échanges gazeux. Cela a aussi un effet bénéfique sur le retour veineux systémique en créant une succion du sang vers le thorax et le cœur *via* les veines caves inférieure et supérieure (Mora Carpio et Mora 2020). Au contraire, lors de la ventilation mécanique, une pression positive est appliquée tout au long du cycle respiratoire. Cette pression intrathoracique positive peut alors nuire au retour veineux et contribuer à diminuer la précharge ventriculaire droite. Moins de sang transite alors par les poumons, ce qui diminue la précharge ventriculaire gauche et peu conséquemment diminuer le remplissage du ventricule gauche pour ultimement diminuer le débit cardiaque. Une atteinte du remplissage ventriculaire gauche peut être évaluée *via* la mesure des fonctions diastoliques dont il sera questions dans la section 5.1.3. En VG, il est connu que l'utilisation d'une PEEP trop élevée peut mener à une diminution du retour veineux au cœur droit et

conséquemment causer une hypotension artérielle en lien avec la diminution du débit cardiaque. En contrepartie, l'utilisation d'une PEEP est aussi associée à une diminution de la post-charge ventriculaire gauche en inversant la pression négative à l'intérieur de la cage thoracique, ce qui contribue à améliorer la fonction systolique et le débit cardiaque systémique (Luecke et Pelosi 2005). Il est tout de même important de préciser qu'une diminution du remplissage du ventricule gauche (par diminution du retour veineux ou diminution de la compliance du ventricule gauche) ne mène pas systématiquement à une diminution du débit cardiaque. En effet, chez un individu sain à terme, des mécanismes compensatoires vont se mettre en branle afin de maintenir la pression artérielle systémique. Par exemple, une diminution du remplissage ventriculaire gauche (plus faible volume télédiastolique) va mener à un volume d'éjection télésystolique plus faible et conséquemment une baisse du débit cardiaque. Cette baisse du débit cardiaque va être décelée par une diminution de la tension artérielle au niveau des barorécepteurs du sinus carotidien et l'arc aortique. Conséquemment, des adaptations locales et systémiques de l'équilibre du tonus sympathique et parasympathique vont effectivement promouvoir une vasodilatation périphérique et donc augmenter le retour du sang vers le coeur.

Lorsqu'on transpose ces phénomènes en VLT, où l'on introduit le PFOB 1500 fois plus dense que l'air dans les poumons, l'impact potentiel sur le système cardio-vasculaire thoracique est à prendre en considération. Il est important de s'assurer qu'on ne cause pas de fluctuations délétères du débit cardiaque. Les prématurés sont particulièrement vulnérables aux fluctuations de pression artérielle systémique due à leur immaturité du système d'autorégulation de la pression artérielle cérébrale. Une diminution de la pression artérielle cérébrale peut alors être associée à une diminution de la perfusion cérébrale. Cette hypoxémie peut nuire au développement neurologique du patient et contribuer au VIBI (Albertine 2012). Plusieurs mécanismes pourraient être associés à la l'introduction d'un liquide dense dans les poumons. D'abord, l'ajout d'une pression positive intrathoracique peut nuire au retour veineux *via* les veines caves en augmentant la pression au niveau de l'oreillette droite. Cela pourrait augmenter la pression veineuse centrale et aussi diminuer la précharge du ventricule droit. Moins de sang qui circule dans les poumons va nuire au remplissage normal du ventricule gauche et conséquemment diminuer le débit cardiaque.

Ainsi, plusieurs études ont été effectuées au fil des années afin d'évaluer les répercussions de la VLT sur la stabilité hémodynamique. Comme mentionné précédemment, les résultats de ces études sont inconstants: Curtis et al. ont, par exemple, noté qu'il n'y avait pas de diminution du débit cardiaque chez le porcelet durant la VLT lorsque la précharge est augmentée par l'administration de salin. À l'inverse, Lowe et al. ont observé chez des chats adultes une diminution du débit cardiaque de près de 40 % et avait, à l'époque, énoncé l'hypothèse qu'un liquide très dense comme le PFOB dans les poumons pourrait comprimer le cœur, l'aorte et les veines caves, venant ainsi perturber le débit cardiaque. Il est pertinent de noter que Lowe et al. utilisaient des V_T de 22 ml/kg alors que Curtis et al. utilisaient des V_T d'environ 16 ml/kg. Cette différence a peut-être contribué à cette discordance apparente de tolérance entre les 2 études (Lowe et al. 1979, Curtis et al. 1991). Cela dit, les deux études mentionnées ci-dessus ont été effectuées avec des ventilateurs liquidiens beaucoup moins sophistiqués qu'INOLIVENT-6 qui permettent maintenant de minimiser les volumes pulmonaires. Plus récemment, Tsagogiorgas et al., ont montré avec un ventilateur liquidien plus récent que la ventilation liquidienne n'altérerait pas le retour veineux central de même que la pression artérielle pulmonaire. Ils ont également montré que le débit cardiaque ne changeait pas de façon statistiquement significative en comparaison à la ventilation gazeuse. Ainsi, aucune étude n'a spécifiquement évalué l'effet de la VLT au niveau du remplissage du ventricule gauche.

Il a été décidé d'évaluer principalement l'effet de la VLT sur le remplissage du ventricule gauche comme Lowe et al., avait mentionné que l'ajout du liquide dans les poumons pourrait comprimer directement le cœur. Dans cette optique, il a été supposé que les poumons remplis de liquide puissent nuire au remplissage du ventricule gauche. Un ventricule moins bien rempli ne mène pas nécessairement à une diminution du débit cardiaque alors que plusieurs mécanismes compensatoires peuvent être enclenchés, notamment au niveau de la vasodilatation périphérique permettant un plus grand retour veineux au cœur. Encore une fois, bien que cela soit vrai chez des modèles à terme, chez des modèles extrêmement prématurés, les mécanismes compensatoires ne permettent pas toujours de s'ajuster afin de maintenir un débit cardiaque constant (Rhee et al. 2018). C'est

pourquoi il était important d'abord dans un modèle à terme d'évaluer les répercussions hémodynamiques de la VLT et principalement au niveau du remplissage du ventricule gauche *via* l'évaluation des fonctions diastolique.

C'est pourquoi un projet a été élaboré chez l'agneau nouveau-né à terme avec détresse induite en surfactant (modèle proche de la MMH des grands prématurés en termes de détresse respiratoire). Ce projet a fait l'objet d'un premier article de thèse.

4.1.1 Hypothèse principale

L'utilisation de la VLT avec une approche à faibles volumes pulmonaires modifiera peu l'hémodynamique, en particulier sur le remplissage du ventricule gauche, chez l'agneau nouveau-né avec déficit induit en surfactant.

4.1.2 Hypothèse secondaire

L'utilisation de la VLT permet d'assurer des échanges gazeux adéquats chez l'agneau nouveau-né avec déficit induit en surfactant.

4.1.3 Objectif principal

L'objectif principal est d'évaluer les répercussions hémodynamiques de la VLT, avec une attention particulière portée à la fonction diastolique du ventricule gauche.

4.1.4 Objectif secondaire

L'objectif secondaire est d'évaluer si la VLT permet d'assurer des échanges gazeux adéquats.

4.2 Distribution du bromure de perfluorooctyle durant la ventilation liquidienne totale

Dans le cadre des différentes études effectuées en VLT dans le laboratoire, il a été soulevé que la phase de remplissage était souvent associée à une instabilité transitoire de la saturation artérielle en oxygène de l'hémoglobine. Un remplissage trop rapide pourrait ne pas permettre une évacuation et/ou une dissolution du gaz résiduel dans les alvéoles et causer une surdistention dans les régions non dépendantes. À l'inverse, un remplissage trop lent pourrait être associé à de profondes désaturations. L'évaluation de la distribution régionale du volume de remplissage en PFC était donc importante pour comprendre cette période de transition et évaluer la sécurité d'un remplissage rapide.

Cette phase de remplissage initial en VLT, incluant la distribution du volume de PFC, n'a que très peu été décrite. Wolfson et Shaffer ont affirmé, en 2005, que l'air contenu dans les poumons était soit dissout dans le PFC ou encore éliminé durant l'expiration (Wolfson et Shaffer 2005). De son côté, en 1994, Hirschl et al. avait montré chez des moutons juvéniles avec détresse respiratoire induite par injection d'acide oléique que les poumons étaient complètement remplis de PFC après 1 heure de VLT lors de l'analyse *post mortem* en tomодensitométrie (Hirschl et al. 1994). Aucune de ces études ne s'est réellement attardée à la transition de la ventilation gazeuse à liquidienne.

Malgré les théories selon lesquelles la VLT serait associée à un recrutement alvéolaire plus homogène, peu de données supportent vraiment cette affirmation (Hirschl et al. 1995, Tooley et al. 1996). La tomographie d'impédance électrique (TIE) et la fluoroscopie permettent de suivre en temps réel la distribution régionale du V_T en VLT. La TIE permet aussi d'évaluer la perfusion sanguine *via* l'injection intraveineuse de salin hypertonique et ainsi d'estimer les impacts de la VG et VLT sur les rapports V/Q régionaux. Il a donc été possible d'évaluer si le PFOB entraînait une redistribution du sang des zones dépendantes vers les zones non-dépendantes en début de VLT. Les deux techniques sont décrites dans l'article 2 (*Section 5.2*) ci-dessous.

C'est donc dans cette optique qu'un 2^e projet a été élaboré, toujours chez l'agneau à terme avec déficit induit en surfactant. Ce projet a mené à la rédaction d'un deuxième article dans le cadre de cette thèse.

4.2.1 Hypothèse principale

Le PFOB se distribue principalement dans les zones dépendantes lors du remplissage en VLT et n'engendre pas de surdistension.

4.2.2 Hypothèse secondaire

La VLT permet une distribution du V_T plus homogène qu'en ventilation gazeuse.

4.2.3 Objectif principal

Évaluer la distribution du PFOB et de l'air lors du remplissage initial en VLT chez un modèle ovin de déficit induit en surfactant *via* l'utilisation de la TIE et de la fluoroscopie.

4.2.4 Objectif secondaire

Évaluer comment la perfusion sanguine pulmonaire s'adapte en fonction de la distribution du V_T .

4.3 Effet du V_T sur l'inflammation en ventilation liquidienne totale

En VG, l'utilisation d'un V_T élevé a été associée au VILI (Ciuffini et al. 2018, Farrell et al. 2018). Le VILI s'accompagne généralement d'une expression accrue de gènes associés à l'inflammation comme l'*IL1*, l'*IL6* et le *TNF- α* (Huusko et al. 2014). Ceci entraîne une augmentation de la perméabilité alvéolaire, une exsudation plasmatique et une infiltration de cellules inflammatoires pouvant alors relâcher des molécules pro-inflammatoires et des radicaux libres. L'ensemble contribue alors à altérer l'intégrité cellulaire de la paroi alvéolaire et les capacités tensio-actives du surfactant (Perrone et al. 2012). Il s'ensuit une diminution de la compliance pulmonaire et de la qualité des échanges gazeux. Chez les prématurés, cette inflammation est à la base notamment de la fibrogenèse et de l'altération du développement normal des poumons menant à la DBP (Perrone et al. 2012).

Or, en VLT, il n'est pas possible d'utiliser la même FR qu'en VG. Le PFC est trop dense et visqueux pour être échangé de 30 à 60 fois par minute. La faible diffusion des gaz dans le PFOB amène un défi supplémentaire. La plus faible proportion de PFOB oxygéné entrant par rapport au volume de fin d'expiration, comme c'est le cas lors de l'utilisation d'une fréquence élevée et d'un faible V_T , pourrait diminuer les échanges gazeux (Koen et al. 1988, Costantino et Fiore 2001). Un V_T plus élevé (de 15 à 20 ml/kg) et une FR plus basse (3-6 respirations/minute) qu'en VG sont donc généralement utilisés en VLT (Wolfson et Shaffer 2005). L'utilisation d'une FR plus élevée a, en somme, toujours été limitée par l'absence de ventilateur liquidien capable de les soutenir. De plus, l'augmentation de FR peut s'accompagner de collapsus expiratoires de la trachée comme expliqué dans la *section 3.1.3*. Le collapsus peut notamment faire en sorte de limiter le V_T expiré, causant une accumulation du volume liquidien dans les poumons à chaque cycle si le respirateur ne mesure pas étroitement l'EELV. Cette accumulation peut alors être associée à une surdistension pulmonaire, à une instabilité hémodynamique et à la survenue de perfluorothorax (Costantino et al. 2004, Bagnoli et al. 2007). Tel qu'énoncé précédemment, l'algorithme de gestion des collapsus implémenté dans INOLIVENT-6 a permis de repousser les limites des FR utilisées, tout en limitant les collapsus.

Aucune étude n'a vraiment étudié l'impact de différents niveaux de V_T sur l'inflammation pulmonaire. Jiang et al. ont démontré chez des porcelets qu'un faible V_T (6 ml/kg) était associé à une plus faible expression d'*IL6* et d'*IL8* (ARNm et protéines du plasma) en comparaison avec l'utilisation d'un grand V_T (25 ml/kg) (Jiang et al. 2016). Ceci dit, les auteurs ont utilisé une technique d'épuration du CO_2 extracorporelle leur permettant d'atteindre un V_T aussi faible sans effet délétère sur les échanges gazeux. Il n'est donc pas possible d'extrapoler les résultats à une VLT où l'on doit assurer les échanges gazeux sans induire d'inflammation. De plus, l'utilisation d'épuration extracorporelle du CO_2 , tout comme la majorité des techniques d'oxygénation extracorporelle, est proscrite chez les extrêmes prématurés dus à leur petite taille. Kohlhauer et al. ont montré, dans le contexte d'une VLT hypothermisante de courte durée (30 minutes), que le maintien d'un faible volume pulmonaire de perflubron à la fin de l'expiration (inférieur à 20 ml/kg) était associé à moins d'inflammation pulmonaire (Kohlhauer et al. 2019). Bien que les travaux de Kohlhauer aient influencé la tendance à limiter le volume en VLT dans les dernières années, l'utilisation de volumes de fin d'expiration très faibles (inférieur à 20 ml/kg) n'est pas possible chez l'agneau néonatal. De plus, cette dernière étude a été réalisée sous hypothermie, ce qui a limité la consommation d' O_2 et la production de CO_2 , et la VLT se limitait à 30 minutes. Il était donc plus facile de maintenir des échanges gazeux acceptables dans un tel contexte. Ainsi, il était nécessaire d'élaborer un projet visant à identifier les paramètres respiratoires optimaux à utiliser chez un modèle ovin nouveau-né pour une VLT de 4 heures.

Finalement, la possibilité d'un retour en respiration spontanée chez l'animal néonatal après la VLT a été très peu rapportée dans la littérature. Il serait vain d'envisager des études précliniques sérieuses en VLT sans d'abord s'assurer que la technique permette un retour en respiration spontanée. Parmi les études rapportées, Kohlhauer et al. ont sevré complètement (jusqu'à une respiration spontanée sans aucune aide respiratoire) des porcelets après 30 minutes de VLT, des porcs adultes et des chimpanzés adultes (Kohlhauer et al. 2019). Chez des modèles néonataux, Jackson et al. ont effectué un retour en respiration spontanée chez des primates ($n = 3$) peu prématurés suivant une VLT de 3 heures (Jackson et al. 1994). Stavis et al. ont réussi à sevrer des agneaux à terme ($n = 3$) après 16 heures suivant une VLT

de 4 heures (Stavis et al. 1998). Plus récemment, nous avons montré la possibilité de sevrer des agneaux atteints du syndrome d'aspiration méconiale traités par une VLT de 4 heures; cependant, une période de sevrage de près de 23 heures post-VLT était requise avant le retrait du tube endotrachéal. Les agneaux présentaient aussi une détresse respiratoire légère à modérée suite au sevrage. Ces résultats ont fait l'objet d'une communication orale en congrès (American Thoracic Society, 2015). La possibilité de sevrer des animaux nouveau-nés de manière systématique et sans complication restait à être démontrée afin de dépasser le stade de preuve de concept et envisager une étude chez l'humain.

Un projet a donc été élaboré pour identifier les meilleures modalités de VLT limitant l'inflammation pulmonaire et confirmer qu'il est possible de sevrer les agneaux de la VLT. Ce projet est donc à la base du 3^e article effectué dans le cadre de cette thèse.

4.3.1 Hypothèse principale

L'utilisation d'un petit V_T et d'une FR élevée durant la VLT de 4 heures permet de limiter l'inflammation pulmonaire mesurée par score histologique et RT-qPCR.

4.3.2 Hypothèse secondaire

La VLT permet un retour en respiration spontanée en moins de 4 heures post-VLT.

4.3.3 Objectif principal

L'objectif principal est d'évaluer si la VLT avec un V_T de 10 ml/kg et une FR de 10 /min engendre moins d'inflammation qu'une VLT avec un V_T de 20 ml/kg et une FR de 5 /min; l'inflammation est mesurée par RT-qPCR et score histologique.

4.3.4 Objectif secondaire

L'objectif secondaire est d'évaluer la possibilité d'effectuer un retour en respiration spontanée en moins de 4 heures après une VLT de 4 heures.

CHAPITRE 5. RÉSULTATS OBTENUS

Article 1: Assessing the impacts of total liquid ventilation on left ventricular diastolic function in a model of neonatal respiratory distress syndrome

5.1.1 Avant-propos

Auteurs : Sage M, Nadeau M, Forand-Choinière C, Mousseau J, Vandamme J, Berger C, Tremblay-Roy J-S, Tissier R, Micheau P, Fortin-Pellerin É.

Statut de l'article : Publié (PMID 29377922)

Journal : *Plos One* 13(1) : e0191885, 2018

Contributions:

Pour cet article, j'ai participé à la majorité des étapes menant à sa rédaction incluant toutes les expérimentations, l'analyse des données et l'écriture du manuscrit sous la supervision de mes directeurs de recherche. Implication : 80%.

5.1.2 Résumé

Mise en contexte : Le remplissage pulmonaire avec du PFOB, un liquide dense, au moment de l'initiation de la VLT, peut comprimer le cœur et pourrait expliquer l'instabilité occasionnellement rapportée. L'objectif est d'évaluer l'impact de la VLT sur le système cardiorespiratoire, en particulier sur la fonction diastolique du ventricule gauche, chez un modèle ovin de déficit en surfactant.

Méthode : Huit agneaux nouveau-nés, âgés de $3,0 \pm 0,4$ jours et pesant $3,2 \pm 0,3$ kg, ont été utilisés dans cette étude expérimentale croisée. Les agneaux ont été intubés, anesthésiés et paralysés. Des cathéters ont été introduits dans les artères fémorale et pulmonaire. Un capteur de pression haute-fidélité a été introduit dans le ventricule gauche. Le déficit en surfactant a été induit par lavages répétés avec du sérum physiologique. La VLT a été maintenue durant 2 heures avec un prototype de ventilateur liquidien. Des mesures d'échographie thoracique et de débit cardiaque par thermodilution ont été effectuées avant et pendant la VLT.

Résultats : La pression télédiastolique du ventricule gauche (LVEDP, $9,3 \pm 2,1$ vs. $9,2 \pm 2,4$ mmHg, $p = 0,89$), le diamètre télédiastolique du ventricule gauche ($1,90 \pm 0,09$ vs. $1,86 \pm 0,12$ cm, $p = 0,72$), le changement de pression en fonction du temps dp/dt négatif (-2589 ± 691 vs. -3115 ± 866 mmHg/s, $p = 0,50$) et le débit cardiaque (436 ± 28 vs. 481 ± 59 ml/kg/min, $p = 0,26$) n'ont pas été affectés par l'initiation de la VLT. La constante de relaxation ventriculaire gauche (tau) a légèrement augmenté de $21,5 \pm 3,3$ à $24,9 \pm 3,7$ ms ($p = 0,03$). La pression artérielle moyenne systémique (48 ± 6 vs. 53 ± 7 mmHg, $p = 0,38$) et pulmonaire ($31,3 \pm 2,5$ vs. $30,4 \pm 2,3$ mmHg, $p = 0,61$) sont restées stables. Tel qu'anticipé, la phase d'inspiration durant la VLT était associée à des effets significatifs mais limités sur la plupart des variables (ex. la pression veineuse centrale a augmenté de $2,6 \pm 0,5$ mmHg, $p = 0,001$ et la LVEDP de $1,18 \pm 0,12$ mmHg, $p < 0,001$)

Conclusion : La VLT est bien tolérée chez le modèle ovin néonatal de détresse respiratoire utilisé et a des impacts limités sur la fonction diastolique du ventricule gauche lorsque comparé à la ventilation mécanique conventionnelle.

5.1.3 Article 1

Assessing the impacts of total liquid ventilation on left ventricular diastolic function in a model of neonatal respiratory distress syndrome

Michaël Sage¹, Mathieu Nadeau², Claudia Forand-Choinière¹, Julien Mousseau², Jonathan Vandamme², Claire Berger³, Jean-Sébastien Tremblay-Roy¹, Renaud Tissier⁴, Philippe Micheau² and Étienne Fortin-Pellerin¹

¹ Department of Pediatrics and Department of Pharmacology and Physiology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

² Department of Mechanical Engineering, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

³ Department of Medicine, Université de Poitiers, Poitiers, France.

⁴ Inserm, Unité 955, Equipe 03, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est Créteil, Paris, France.

*All the experimentations were performed at the animal facility of Université de Sherbrooke, Canada.

Corresponding author

Dr Étienne Fortin-Pellerin

Department of Pediatrics, Division of Neonatology, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke

email: etienne.fortin-pellerin@usherbrooke.ca

Word count: 3317

ABSTRACT

Background: Filling the lung with dense liquid perfluorocarbons during total liquid ventilation (TLV) might compress the heart, a plausible explanation for the instability occasionally reported with this technique. Our objective is to assess the impacts of TLV on the cardiovascular system, particularly left ventricular diastolic function, in an ovine model of neonatal respiratory distress syndrome.

Method: Eight newborns lambs, 3.0 ± 0.4 days (3.2 ± 0.3 kg) were used in this crossover experimental study. Animals were intubated, anesthetized and paralyzed. Catheters were inserted in the femoral and pulmonary arteries. A high-fidelity pressure catheter was inserted into the left ventricle. Surfactant deficiency was induced by repeated lung lavages with normal saline. TLV was then conducted for 2 hours using a liquid ventilator prototype. Thoracic echocardiography and cardiac output assessment by thermodilution were performed before and during TLV.

Results: Left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) (9.3 ± 2.1 vs. 9.2 ± 2.4 mmHg, $p=0.89$) and dimension (1.90 ± 0.09 vs. 1.86 ± 0.12 cm, $p = 0.72$), negative dP/dt (-2589 ± 691 vs. -3115 ± 866 mmHg/s, $p = 0.50$) and cardiac output (436 ± 28 vs. 481 ± 59 ml/kg/min, $p = 0.26$) were not affected by TLV initiation. Left ventricular relaxation time constant (τ) slightly increased from 21.5 ± 3.3 to 24.9 ± 3.7 ms ($p = 0.03$). Mean arterial systemic (48 ± 6 vs. 53 ± 7 mmHg, $p = 0.38$) and pulmonary pressures (31.3 ± 2.5 vs. 30.4 ± 2.3 mmHg, $p = 0.61$) were stable. As expected, the inspiratory phase of liquid cycling exhibited a small but significant effect on most variables (i.e. central venous pressure $+ 2.6 \pm 0.5$ mmHg, $p = 0.001$; LVEDP $+1.18 \pm 0.12$ mmHg, $p < 0.001$).

CONCLUSIONS: TLV was well tolerated in our neonatal lamb model of severe respiratory distress syndrome and had limited impact on left ventricle diastolic function when compared to conventional mechanical ventilation.

INTRODUCTION

Total liquid ventilation (TLV) uses liquid perfluorochemicals (PFC), known for their ability to dissolve high quantities of oxygen and carbon dioxide, in order to fill and ventilate the lungs using a dedicated liquid ventilator. This technique differs from partial liquid ventilation [1] since the lung is no longer subjected to conventional ventilation or to an air-liquid interface. Given that PFCs feature a very low surface tension and improve lung compliance [2, 3], TLV is appealing for the treatment of the premature infant suffering from respiratory distress syndrome due to lack of endogenous surfactant [4]. Unfortunately, the development of dedicated ventilators for TLV has been a challenge, and administration of poorly-controlled PFC volume has led to serious complications, such as lung overdistention and fluorothoraces [5]. Throughout the years, these ventilators have evolved from basic systems using gravity in order to fill and empty the lungs [6] to a dual-piston ventilator driven by complex ventilation algorithms [7-12]. The INOLIVENT prototype [8-12] (fig 1) used for this study allows for the precise control over the volumes administered during TLV while continuously monitoring applied pressures.

As we progress from the proof of concept stage and envision human clinical trials, refinement of TLV ventilation techniques and safety assessment become increasingly important. Reports of the impact of TLV on hemodynamic stability have been inconsistent. Lowe et al. observed a 40% decrease in cardiac output (CO) during TLV [13]. The authors hypothesized that fluid-filled lungs by dense PFC (i.e. 1.93 g/ml for perflubron used in the present study) may compress the heart, great veins and aorta. Curtis et al., however, showed that increasing preload allowed the maintenance of CO for several hours during TLV [6]. We suspect that distinct TLV strategies, especially those related to the administered PFC volumes, differentially affect the various cardiovascular structures, just as for conventional ventilation approaches [14]. Indeed, the study by Lowe et al. featured higher liquid tidal volumes (22 ml/kg) than the volumes in the Curtis et al. study (approx. 16 ml/kg), with very high total PFC volume at end inspiration (75ml/kg in Lowes et al. while not reported in Curtis et al.), potentially explaining differences in hemodynamic responses. Moreover, high proximal inspiratory pressures must be generated by the ventilator in order to instill the viscous PFC into the lungs. Such pressure, although decreasing rapidly within the ventilator

circuit and subsequently in the proximal airways, may contribute to the fluctuation documented in systemic arterial blood pressure [5, 7] and other hemodynamic variables. For example, using the INOLIVENT prototype, it was shown that for an inspiratory pressure of 90 cmH₂O measured proximally to the endotracheal tube, the pressure at the distal end of the tube had already dropped to 30 cmH₂O while ventilating with perflubron [15] (pressure measurement sites shown in fig 1).

In light of the above, the objective of the present study was to assess the impacts of TLV on the cardiovascular system, in particular left ventricular (LV) diastolic function, in a neonatal lamb model on respiratory distress syndrome using the INOLIVENT prototype. We hypothesize that our current TLV approach, focusing on the use of the lowest possible volumes (i.e. tidal and total PFC volumes) will have very limited impact on hemodynamic stability and LV diastolic function.

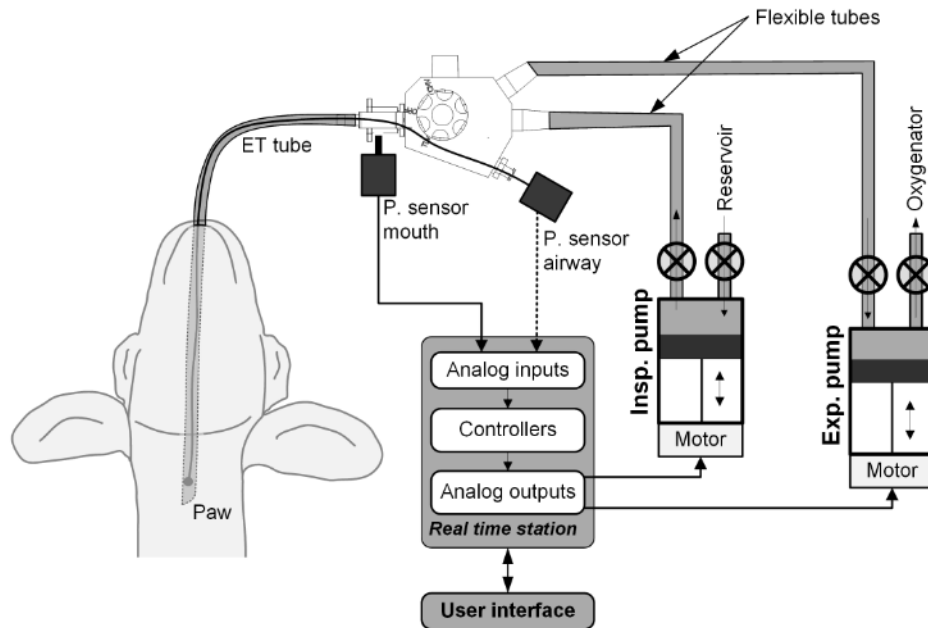


Fig 1. The INOLIVENT-6 liquid ventilator prototype. The inspiratory pump (Insp. Pump) delivers the tidal inspiratory volume of perflubron into the lungs. The expiratory pump (Exp. Pump) removes the tidal expiratory volume of perflubron from the lungs. The pressure sensor located at the mouth (P. sensor mouth) is used to limit the driving inspiratory and expiratory pressures and to monitor the pause pressure. P. sensor airway was previously used in the past to characterize the pressure drop although is no longer used.

MATERIAL AND METHODS

This experimental crossover study was conducted in eight term newborn male lambs 1 to 4 days of age. It is part of a larger project aimed at the assessment of TLV potential in treating respiratory distress syndrome of the newborn. This study was approved by the animal research ethics board of the Université de Sherbrooke (Protocol number: 401-16BR) and was designed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Anesthesia, instrumentation and induction of surfactant deficiency

Lambs were premedicated with ketamine (10 mg/kg, IM) prior to percutaneous left jugular vein cannulation. After intubation with a 4.5 mm cuffed endotracheal tube, lambs were placed in supine position and conventional mechanical ventilation was initiated (Servo-300; Siemens-Elema, Solna AB, Solna, Sweden) in a pressure regulated mode, with a positive end-expiratory pressure of 5 cmH₂O and a peak inspiratory pressure adjusted to generate 7 ml/kg of tidal volume. Hemoglobin saturation was continuously recorded by pulse oximetry (Radical, Masimo, Irvine, CA). Lambs were maintained under general anesthesia during the entire experiment (propofol 120 mcg/kg/min, ketamine 1 mg/kg/h, along with a D10W at a rate of 6 ml/kg/h) and received a single dose of fentanyl 4 µg/kg before instrumentation. A 5 Fr Swan-Ganz catheter (132F5, Edwards Lifesciences, Irvine, CA) was inserted into the right external jugular vein through a cervical cutdown and advanced to the pulmonary artery for pressure measurements. A proximal port was used to monitor central venous pressure (CVP). A 3 Fr catheter (PV2013L07, PiCCO catheter; Pulsion Medical System, Munich, Germany) was inserted into the right femoral artery through a cutdown to allow for measurements of systemic arterial pressure and cardiac output using the thermodilution technique [16]. A high-fidelity 3.5 Fr microtip pressure catheter (SPR-524, Millar Instruments inc., Houston, TX) was introduced into the right carotid and advanced to the left ventricle (LV) for pressure measurements. Repeated lung lavages using 10 ml/kg of warmed saline were performed until PaO₂ reached a value of < 100 torr under 100% FiO₂ for at least 20 minutes. A decision was made prior to experimentations not to correct eventual acidosis in order to avoid masking progressive hemodynamic deterioration and poor perfusion. Following completion of the experiments, lambs were euthanized with an overdose of pentobarbital (100 mg/kg iv).

TLV protocol

Lambs were disconnected from the gas ventilator for 5 seconds to allow for lung deflation (0 cmH₂O positive end expiration pressure) prior to initiation of TLV. Lungs were then filled with 25 ml/kg of perflubron at 39°C (Exflur, Round Rock, TX) over 18 sec, using the INOLIVENT-6 liquid ventilator prototype [9, 10]. End expiratory PFC volume was then increased progressively over the next 3-4 cycles to approximately 30 ml/kg in order to allow for air evacuation and limit total lung volume. Volume-controlled, pressure-limited and time-cycled TLV was then initiated aimed at the following parameters: tidal volume of 11-14 ml/kg, respiratory rate of 6-10 cycles/min and inspiratory/expiratory ratio of 1:2. End expiratory lung volume was carefully minimized to avoid expiratory tracheal collapses. Ventilation parameters were set so as to maintain oxygen saturation levels above 90% and PaCO₂ between 50-65 torr [17]. The INOLIVENT-6 prototype monitors both the inspiratory and expiratory pause pressures as well as the pressure during PFC movement in and out of the lungs (fig 2). The pressure sensor is located immediately proximal to the junction between the ventilator and the endotracheal tube (fig 1).

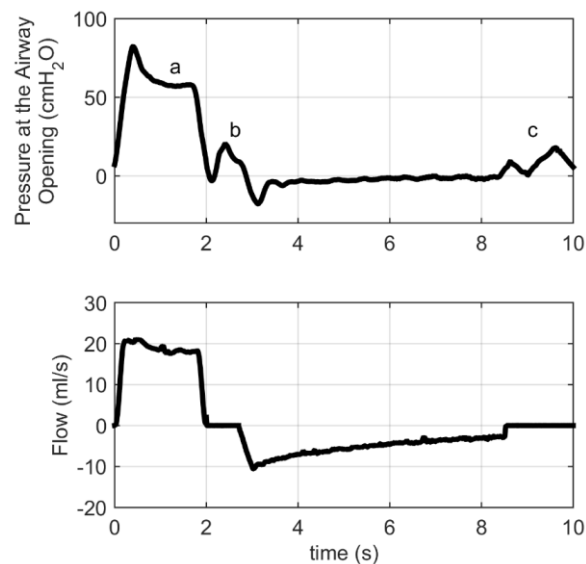


Fig 2. Pressure and flow during total liquid ventilation, measured upstream of the endotracheal tube. The pressure generated by the ventilator, while fluid is instilled into the lungs, is identified by the letter "a" on the upper panel. As the movement of PFC stops ("b" at end inspiration and "c" at end expiration), pressure oscillates around a value that can be extrapolated [18]. These values, called pause pressures, are the alveolar pressures at end inspiration and end expiration.

Variables and statistical analysis

Central venous pressure (CVP), LV pressure, mean systemic arterial pressure (MSAP) and mean pulmonary arterial pressure (MPAP) were continuously recorded with AcqKnowledge (MP100, Biopac, Goleta, CA). Values were obtained just before disconnecting the subject from the conventional gas ventilator and 1 minute after initiation of TLV. LV end diastolic pressure (LVEDP, a diastolic function marker) was measured and both systolic (dP/dt) and diastolic (negative dP/dt , tau) function markers were generated by the software. Both positive and negative dP/dt are obtained from the derivative of the pressure curve. For tau calculation, the relaxation period is defined as the range of data between the time of minimum dP/dt in the cycle to the point where the LV pressure signal drops below the previous LVEDP level. Within this range, the following model is fitted to the data using the simplex search method:

$$P_0 e^{\frac{t}{\tau}}$$

where P_0 is the value of the left ventricular pressure signal at the time of dP/dt minimum and t is the time coordinate shifted such that t is 0 at the time of dP/dt minimum. The best fit value from this model is used as the value of the relaxation time constant. Variables derived from LV pressure recordings were averaged from 5 heart beats during the inspiratory as well as expiratory phases of TLV.

Shortening fraction and left ventricle end diastolic diameter were measured by echocardiography before and after 2 hours of TLV (M-Turbo Ultrasound System, Sonosite, Bothell, WA) using accepted guidelines [19]. M-mode was used on a parasternal short-axis view at the level of the tip of the mitral valve leaflets and averaged over 3 cardiac cycles. Due to the complexity of the protocol, echocardiographic measurements could not be performed immediately after the initiation of TLV but rather between 1 and 2 hours after filling. Cardiac output was measured before and after 2 hours of TLV using the transpulmonary thermodilution method (injection of 4 ml cold saline through the jugular vein and temperature assessment at the femoral arterial line, repeated 3 times for each timepoint) [16]. Arterial blood gases were measured at each phase of the experiment (Rapidlab 348, Siemens, AB, Solna, Sweden). Data are presented as mean \pm SEM. Paired t-test was used

for comparisons. All statistical analyses were performed using SPSS 19 software (IBM, North Castle, NY). A p-value of < 0.05 was deemed to be statistically significant.

RESULTS

Eight lambs aged 3.0 ± 0.4 days of life and weighing 3.2 ± 0.3 kg were used. Lambs reached entry criteria after 9 ± 3 lung lavages. The animals presented a severe respiratory distress after the insult and the peak inspiratory pressure had to be increased to maintain tidal volume (15.0 ± 0.6 vs. 20.9 ± 1.3 cmH₂O, $p < 0.001$). pH decreased from 7.31 ± 0.04 to 7.12 ± 0.03 ($p < 0.001$), PCO₂ increased from 42 ± 2 to 61 ± 2 torr ($p = 0.001$), PaO₂/FiO₂ decreased from 297 ± 37 to 70 ± 7 ($p < 0.001$) and HCO₃ decreased from 20 ± 2 to 16 ± 1 mmol/l ($p = 0.02$). Blood pressure also decreased significantly from 68 ± 8 to 48 ± 6 mmHg ($p = 0.03$). The lungs were thereafter filled with PFC followed by initiation of ventilation using tidal volumes of 12.6 ± 0.4 ml/kg at a rate of 6.5 ± 0.2 cycles/min. After 1 minute of TLV, PFC end expiratory volume was stabilized at 29.1 ± 0.5 ml/kg.

Effect of TLV initiation on LV diastolic function and hemodynamic stability

TLV did not affect LV end diastolic pressure or negative dP/dt (fig 3). However, there was a small effect on LV relaxation time constant (tau), from 21.5 ± 3.3 to 24.9 ± 3.7 ms ($p = 0.025$). Assessment of LV end diastolic dimension (LVEDD) and cardiac output performed between 1 and 2 hours of TLV revealed that LVEDD was preserved (fig 3), as was cardiac output (436 ± 28 vs. 481 ± 59 ml/kg/min, $p = 0.26$) when compared to post-insult values (i.e. immediately prior to TLV).

TLV was well tolerated. There was a small increase in CVP which did not reach statistical significance (8.5 ± 2.7 vs. 10.0 ± 2.8 mmHg after filling, $p = 0.06$) whereas shortening fraction (28.5 ± 2.3 vs. $30.4 \pm 1.3\%$, $p = 0.36$), MPAP (31.3 ± 2.5 vs. 30.4 ± 2.3 mmHg, $p = 0.61$) and MSAP (48 ± 6 vs. 53 ± 7 mmHg, $p = 0.38$) were all preserved.

Effect of perflubron cycling

Initial inspiratory pause pressure was measured at 18 ± 1 cmH₂O and end expiratory pause pressure at 12 ± 1 cmH₂O (fig 2). Both these pressures decreased within the first minutes of TLV (15 ± 1 and 4 ± 1 , $p = 0.002$ and $p < 0.001$, respectively, after 30 minutes of TLV). The inspiratory pressure (i.e. during fluid movement) measured proximal to the endotracheal tube was 54 ± 5 cmH₂O at the time of the recordings. Fig 4 shows the effects

of TLV cycling (inspiration and expiration phases) on CVP, LEVDP, negative dP/dt, tau, MSAP and MPAP. The inspiration phase was associated with an increase in CVP ($p = 0.001$), LVEDP ($p < 0.001$) and tau ($p = 0.009$). However, MSAP and MPAP were not affected.

Tolerance to the protocol

Lambs received 3.0 ± 1.1 bolus of 10 ml/kg normal saline during anesthesia (415 ± 25 min). MSAP remained in acceptable range during the TLV (53 ± 7 mmHg after initiation of TLV vs. 51 ± 6 at 2 hours, $p = 0.71$) while blood gases gradually stabilized between the insult and 2 hours into the TLV protocol (pH 7.12 ± 3 vs. 7.15 ± 3 , $p = 0.06$; PaO₂ 70 ± 7 vs. 131 ± 13 torr, $p = 0.003$; PCO₂ 61 ± 2 vs. 57 ± 1 torr, $p = 0.18$; HCO₃ 16.2 ± 0.8 vs. 16.9 ± 0.9 mmol/l $p = 0.06$).

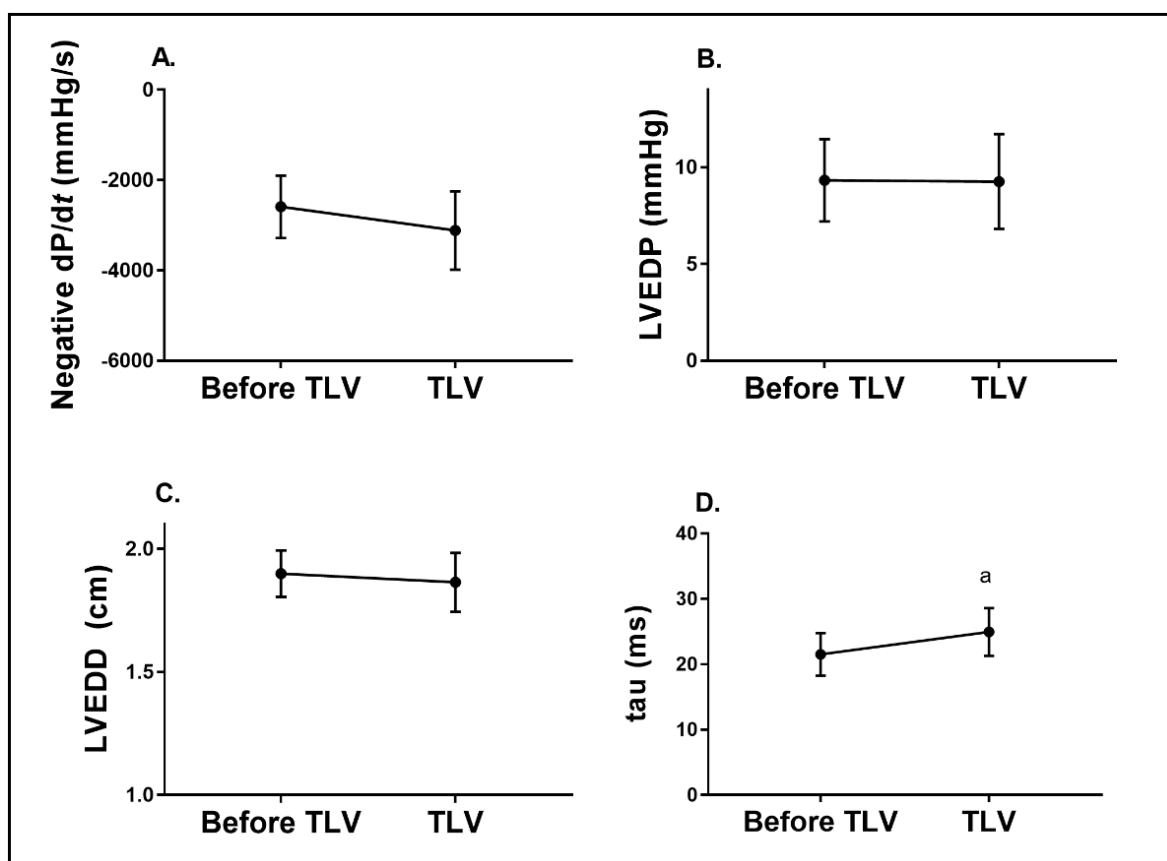


Fig 3. Impact of total liquid ventilation on left ventricle diastolic function. A. Negative dP/dt; B. Left ventricular end diastolic pressure; C. Left ventricular end diastolic dimension; D. Left ventricular relaxation time constant (tau). ^a $p < 0.05$.

DISCUSSION

Reported hemodynamic impacts of TLV have been inconsistent [5-7, 20]. Using the INOLIVENT prototype with a well-defined ventilation strategy, TLV was found to be well tolerated overall in our neonatal lamb model of severe respiratory distress syndrome. Results demonstrated only a subtle effect on LV diastolic function without significant effect on hemodynamic stability. These effects were mostly observed during the inspiratory phase, albeit of limited amplitude.

In 1979, Lowe et al. had hypothesized that the hemodynamic instability documented with TLV could be secondary to direct compression of the myocardium by the liquid-filled lung [13], impeding LV diastolic filling. In the present study, initiation of TLV had no impact on negative dP/dt while tau only increased very mildly. Of further importance, LVEDP did not increase with TLV and there was no immediate effect on blood pressure, thus suggesting preserved LV filling and cardiac output. Subsequent echocardiographic assessment demonstrated good ventricular filling and thermodilution confirmed preserved cardiac output. At most, only subtle changes during the inspiration phase of TLV could be documented.

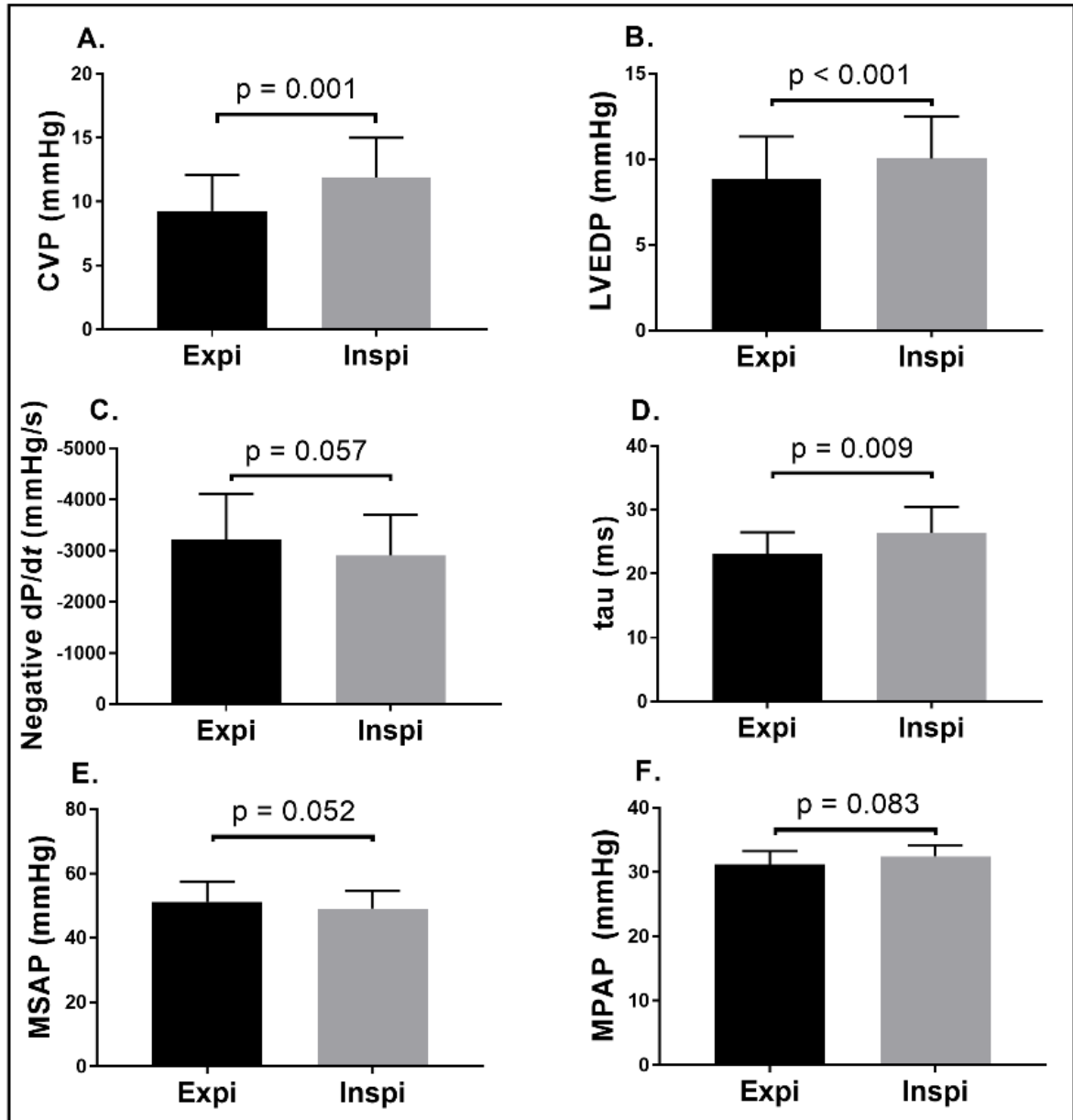


Fig 4. Hemodynamic impact of perflubron cycling. A. central venous pressure; B. Left ventricular end diastolic pressure; C. Negative dP/dt; D. Left ventricular relaxation time constant (tau); E. Mean systemic arterial pressure; F. Mean pulmonary arterial pressure.

Fluctuations in cardiac output as well as arterial blood pressure with respiratory cycle during mechanical ventilation have been reported in both gaseous ventilation [21] and TLV [5, 7]. In the present study, the inspiration phase had an impact on most monitored variables, although the differences were of limited amplitude. This latter finding strengthens a long-

held belief within our team that total volume of PFC within the lungs must be tightly regulated. A recent study also suggested the use of lower volumes to prevent lung inflammation during TLV [22], in keeping with the overwhelming evidence that volutrauma is a significant contributor to ventilator-induced lung injury during conventional mechanical ventilation [23]. Thus, we hypothesize that uncontrolled volumes of PFC within the lung and/or high pause inspiratory and expiratory pressures may affect cardiac function, which may explain earlier findings of instability with less advanced TLV devices. Our results are in agreement with Tsagogiorgas et al. showing no significant effect of TLV on cardiac output, pulmonary vascular resistance and left atrial pressure in a healthy rabbit model [7] using a dedicated ventilator. However, direct measurements of LV diastolic function (τ , negative dP/dt and LVEDD) had not been assessed in this latter study which was performed in healthy mature subjects. A study by Degraeuwe [5], also using a neonatal model of surfactant deficiency, had demonstrated significant variation in hemodynamic parameters with PFC cycling. However, the ventilator used was less sophisticated and end expiratory lung volumes could not be controlled, leading to 3 fluorothoraces and subsequent death of the animals. By tightly matching expiratory to inspiratory PFC volume during cycling, through avoidance of tracheal collapse during expiration [11, 24], end expiratory lung volume can be maintained to a minimal level and thus prevent the development of such complications.

Limitations

Our model had significant multifactorial mixed acidosis that could have affected hemodynamic stability. This acidosis was present prior to PFC filling and improved during TLV, thus we are confident there is no causal relationship between TLV and acidosis. The severity of the hypoxic insult, the use of propofol and restriction of blood flow to the leg secondary to the femoral catheter were likely contributors. Acidosis could have rendered the animals more fragile during TLV. However, given the absence of hemodynamic instability (i.e. the animals maintained cardiac output, blood pressure and diuresis), we are confident in our conclusions. Continuous recording from invasive devices allowed conducting measurements both immediately before and after initiation of TLV, isolating the latter from confounding factors such as prolonged anesthesia, intravenous infusion of normal saline and

pH variation. Unfortunately, cardiac output measurements by thermodilution and echocardiographic studies could not be conducted immediately after filling due to technical reasons. One could assume that these two measurements may have potentially been affected. However, since TLV had very limited immediate effect on both blood pressure and invasive hemodynamic variables, we are once again confident in our general conclusion of good hemodynamic tolerance of TLV.

CONCLUSION

This study demonstrates that TLV does not significantly impede LV filling in a model of neonatal surfactant deficiency using our dedicated ventilator with proper ventilation algorithms and a strategy based on controlling lung PFC volume. The lack of standards in liquid ventilation technologies may explain the inconsistency in previously reported data.

REFERENCES

1. Kaushal A, McDonnell CG, Davies MW. Partial liquid ventilation for the prevention of mortality and morbidity in paediatric acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Cochrane database of systematic reviews. 2013;2:CD003845. PubMed PMID: 23450545.
2. Foust R, 3rd, Tran NN, Cox C, Miller TF, Jr., Greenspan JS, Wolfson MR, et al. Liquid assisted ventilation: an alternative ventilatory strategy for acute meconium aspiration injury. *Pediatr Pulmonol*. 1996 May;21(5):316-22. PubMed PMID: 8726157.
3. Rey-Santano C, Mielgo V, Gastiasoro E, Valls-i-Soler A, Murgia X. Effect of surfactant and partial liquid ventilation treatment on gas exchange and lung mechanics in immature lambs: influence of gestational age. *PloS one*. 2013;8(2):e56127. PubMed PMID: 23418521.
4. Degraeuwe PL, Thunnissen FB, Jansen NJ, Dormaar JT, Dohmen LR, Blanco CE. Conventional gas ventilation, liquid-assisted high-frequency oscillatory ventilation, and tidal liquid ventilation in surfactant-treated preterm lambs. *The International journal of artificial organs*. 2000 Nov;23(11):754-64. PubMed PMID: 11132020.
5. Degraeuwe PL, Vos GD, Geskens GG, Geilen JM, Blanco CE. Effect of perfluorochemical liquid ventilation on cardiac output and blood pressure variability in neonatal piglets with respiratory insufficiency. *Pediatr Pulmonol*. 2000 Aug;30(2):114-24. PubMed PMID: 10922133.
6. Curtis SE, Fuhrman BP, Howland DF, DeFrancis M, Motoyama EK. Cardiac output during liquid (perfluorocarbon) breathing in newborn piglets. *Crit Care Med*. 1991 Feb;19(2):225-30. PubMed PMID: 1989758.

7. Tsagogiorgas C, Alb M, Herrmann P, Quintel M, Meinhardt JP. Cardiopulmonary function and oxygen delivery during total liquid ventilation. *Pediatr Pulmonol*. 2011 Oct;46(10):964-75. PubMed PMID: 21538968.

8. Nadeau M, Sage M, Kohlhauer M, Mousseau J, Vandamme J, Fortin-Pellerin E, et al. Optimal Control of Inspired Perfluorocarbon Temperature for Ultrafast Hypothermia Induction by Total Liquid Ventilation in Adult Patient Model. *IEEE transactions on bio-medical engineering*. 2017 Feb 20. PubMed PMID: 28237918.

9. Nadeau M, Sage M, Kohlhauer M, Vandamme J, Mousseau J, Robert R, et al. Thermal Dynamics in Newborn and Juvenile Models Cooled by Total Liquid Ventilation. *IEEE transactions on bio-medical engineering*. 2016 Jul;63(7):1483-91. PubMed PMID: 26552070.

10. Sage M, Nadeau M, Kohlhauer M, Praud JP, Tissier R, Robert R, et al. Effect of ultrafast mild hypothermia using total liquid ventilation on hemodynamics and respiratory mechanics. *Journal of Cryobiology*. 2016 Aug;73(1):99-101. PubMed PMID: 27242031.

11. Robert R, Micheau P, Avoine O, Beaudry B, Beaulieu A, Walti H. A regulator for pressure-controlled total-liquid ventilation. *IEEE transactions on bio-medical engineering*. 2010 Sep;57(9):2267-76. PubMed PMID: 19744909.

12. Avoine O, Bosse D, Beaudry B, Beaulieu A, Albadine R, Praud JP, et al. Total liquid ventilation efficacy in an ovine model of severe meconium aspiration syndrome. *Crit Care Med*. 2011 May;39(5):1097-103. PubMed PMID: 21317652.

13. Lowe C, Tuma RF, Sivieri EM, Shaffer TH. Liquid ventilation: cardiovascular adjustments with secondary hyperlactatemia and acidosis. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1979 Nov;47(5):1051-7. PubMed PMID: 511705..

14. Vieillard-Baron A, Matthay M, Teboul JL, Bein T, Schultz M, Magder S, et al. Experts' opinion on management of hemodynamics in ARDS patients: focus on the effects of mechanical ventilation. *Intensive Care Med.* 2016 May;42(5):739-49. PubMed PMID: 27038480.

15. Micheau P, Robert R, Beaudry B, Beaulieu A, Nadeau M, Avoine O, et al. A Liquid Ventilator Prototype for Total Liquid Ventilation Preclinical Studies. In: Carpi A, editor. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. Rijeka: InTech; 2011. p. Ch. 14.

16. Bosse D, Walti H, Robert R, Lebon J, Lesur O, Praud JP, et al. Experimental validation of cardiac index measurement using transpulmonary thermodilution technique in neonatal total liquid ventilation. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*. 2010 Nov-Dec;56(6):557-62. PubMed PMID: 21245803.

17. Ryu J, Haddad G, Carlo WA. Clinical effectiveness and safety of permissive hypercapnia. *Clinics in perinatology*. 2012 Sep;39(3):603-12. PubMed PMID: 22954272. Epub 2012/09/08. eng.

18. Vandamme J, Robert R, Micheau P, Weil F, Germin PS, Avoine O, et al., editors. Alveolar pressure estimation in total liquid ventilation during pauses impeded by tube resonance. *2013 IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA)*; 2013 4-5 May 2013.

19. Lopez L, Colan SD, Frommelt PC, Ensing GJ, Kendall K, Younoszai AK, et al. Recommendations for quantification methods during the performance of a pediatric echocardiogram: a report from the Pediatric Measurements Writing Group of the American Society of Echocardiography Pediatric and Congenital Heart Disease Council. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2010 May;23(5):465-95; quiz 576-7. PubMed PMID: 20451803.

20. Weiswasser J, Lueders M, Stolar CJ. Pressure- versus volume-cycled ventilation in liquid-ventilated neonatal piglet lungs. *Journal of pediatric surgery*. 1998 Jul;33(7):1158-62. PubMed PMID: 9694114.
21. Cheifetz IM. Cardiorespiratory interactions: the relationship between mechanical ventilation and hemodynamics. *Respiratory care*. 2014 Dec;59(12):1937-45. PubMed PMID: 25389353.
22. Jiang L, Feng H, Chen X, Liang K, Ni C. Low Tidal Volume Reduces Lung Inflammation Induced by Liquid Ventilation in Piglets With Severe Lung Injury. *Artificial organs*. 2016 Nov 21. PubMed PMID: 27873331.
23. Hernandez LA, Peevy KJ, Moise AA, Parker JC. Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits. *J Appl Physiol* (1985). 1989 May;66(5):2364-8. PubMed PMID: 2745302.
24. Bagnoli P, Tredici S, Seetharamaiah R, Brant DO, Hewell LA, Johnson K, et al. Effect of repeated induced airway collapse during total liquid ventilation. *ASAIO journal* (American Society for Artificial Internal Organs : 1992). 2007 Sep-Oct;53(5):549-55. PubMed PMID: 17885326.

Article 2: Perflubron distribution during transition from gas to liquid ventilation

5.2.1 Avant-propos

Auteurs: Sage M, Stowe S, Adler A, Forand-Choinière C, Nadeau M, Berger C, Marouan S, Micheau P, Tissier R, Praud J-P, Fortin-Pellerin É.

Statut de l'article : Publié (PMID 30555353)

Journal : *Frontiers in Physiology*, 9:1723, 2018

Contributions:

Pour cet article, j'ai participé à la majorité des étapes menant à sa rédaction incluant les expérimentations, l'analyse des données et l'écriture du manuscrit sous la supervision de mes directeurs de recherche. Implication : 80%.

5.2.2 Résumé

La ventilation liquidienne totale (VLT) avec du perfluorocarbone a montré des résultats prometteurs dans la prise en charge des détresses respiratoires néonatales. Cependant, un des enjeux majeurs de sécurité demeure la compréhension des événements précoces lors de la transition à la VLT. Plus spécifiquement, la distribution et l'élimination du volume d'air résiduel dans les zones non dépendantes. L'objectif était donc de mesurer la distribution du PFOB durant la transition à la VLT par l'utilisation de la tomographie d'impédance électrique complétée par la fluoroscopie chez un modèle ovin néonatal de déficit en surfactant. Huit agneaux nouveau-nés à terme ont été anesthésiés et ventilés en position dorsale. Le déficit en surfactant a été induit par lavages répétés au sérum physiologique. Après les avoir laissé se vider passivement à PEEP 0 cmH₂O pendant 5 secondes, les poumons ont été remplis avec 25 ml/kg de PFOB durant 18 secondes et la VLT a été initiée. Les mesures de TIE ont été effectuées durant les 10 premières minutes puis à 120 minutes par l'entremise d'électrodes placées autour du thorax. De plus, des séquences de fluoroscopie ont été enregistrées durant la phase de remplissage de même qu'à 10 et 60 minutes de VLT. Douze agneaux ont été utilisés comme contrôle pour la comparaison histologique. La transition à la VLT comprend une courte période (1 min) d'augmentation du volume pulmonaire total ($+29 \pm 13 \%$, $p = 0.01$) associée au recrutement des zones pulmonaires dépendantes. L'analyse histologique a montré que la VLT était protectrice dans ces mêmes régions comparativement à la VG ($p = 0.03$). Les régions non dépendantes ont été remplies avec le PFOB durant au moins 10 minutes sans signe de surdistension. La distribution du V_T était plus homogène en VLT que durant la VG précédente. Le remplissage avec le PFOB était associé à une augmentation non statistiquement significative de la distribution sanguine dans les régions non-dépendantes de $46 \pm 17\%$ à $53 \pm 6\%$ ($p = 0.4$). En conclusion, la transition à la VLT nécessite un minimum de 10 minutes et implique une évacuation et/ou une dissolution de l'air dans le PFOB, un recrutement rapide des zones dépendantes et une modification du rapport ventilation-perfusion; durant cette phase, le volume pulmonaire augmente de façon transitoire. En considérant le potentiel délétère des volumes pulmonaire élevés, il faut effectuer la transition avec soin. Les auteurs suggèrent l'utilisation d'un système de suivi en temps réel de la ventilation comme la TIE.

5.2.3 Article 2

PERFLUBRON DISTRIBUTION DURING TRANSITION FROM GAS TO TOTAL LIQUID VENTILATION

Michaël Sage¹, Symon Stowe², Andy Adler², Claudia Forand-Choinière¹, Mathieu Nadeau³, Claire Berger⁴, Sofia Marouan⁵, Philippe Micheau³, Renaud Tissier⁶, Jean-Paul Praud¹, Étienne Fortin-Pellerin^{1*}

¹Departments of Pediatrics and Pharmacology/Physiology, Université de Sherbrooke, QC - Canada.

²Department of Computer Engineering, Carleton University, Ottawa, ON - Canada.

³Department of Mechanical Engineering, Université de Sherbrooke, QC - Canada.

⁴Department of Medicine, Université de Poitiers, Poitiers, France.

⁵Departement of Pathology, Université de Sherbrooke, QC - Canada.

⁶Inserm, Unité 955, Equipe 03, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est Créteil, Paris, France.

Experimentations were performed at the animal facility of the Université de Sherbrooke, Québec (Canada).

***Correspondence:**

Étienne Fortin-Pellerin

Université de Sherbrooke

3001 12th Avenue North, Sherbrooke, QC - Canada

Tel: 819-346-1110, #70564 Fax: 819-564-5398

email: etienne.fortin-pellerin@usherbrooke.ca

Keywords: Liquid Ventilation, Perfluorocarbon, Electrical Impedance Tomography, Fluoroscopy, Newborn lamb

Running head: Transition to liquid ventilation

Funding: This work was funded by the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke and the Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke, and by the Canada Research Chair in Neonatal Pediatric Pulmonology (holder: JPP).

Length: word count 4332; 6 tables/figures

ABSTRACT

Total liquid ventilation (TLV) using perfluorocarbons has shown promising results for the management of neonatal respiratory distress. However, one important safety consideration for TLV is a better understanding of the early events during the transition to TLV, especially regarding the fate of residual air in the non-dependent-lung regions. Our objective was to assess perflubron distribution during transition to TLV using electrical impedance tomography, complemented by fluoroscopy, in a neonatal lamb model of induced surfactant deficiency. Eight lambs were anesthetized and ventilated in supine position. Surfactant deficit was induced by saline lung lavage. After deflation, lungs were filled with 25ml/kg perflubron over 18s, and TLV was initiated. Electrical impedance tomography data was recorded from electrodes placed around the chest, during the first 10min and at 120min of TLV. Lung perfusion was also assessed using hypertonic saline injection during apnea. In addition, fluoroscopic sequences were recorded during initial lung filling with perfluorocarbons, then at 10 and 60min of TLV. Twelve lambs were used as controls for histological comparisons. Transition to TLV involved a short period of increased total lung volume ($p=0.01$) secondary to recruitment of the dependent lung regions. Histological analysis shows that TLV was protective of these same regions when compared to gas-ventilated lambs ($p=0.03$). The non-dependent lung regions filled with perflubron over at least 10 minutes, without showing signs of overdistention. Tidal volume distribution was more homogenous in TLV than during the preceding gas ventilation. Perflubron filling was associated with a non-significant increase in the anterior distribution of the blood perfusion signal, from $46 \pm 17\%$ to $53 \pm 6\%$ ($p = 0.4$). However, combined to the effects on ventilation, TLV had an instantaneous effect on ventilation-perfusion relationship ($p=0.03$), suggesting better coupling. Conclusion: transition to TLV requires at least 10 minutes, and involves air evacuation or dissolution in perflubron, dependent lung recruitment and rapid ventilation-perfusion coupling modifications. During that time interval, the total lung volume transiently increases. Considering the potential deleterious effect of high lung volumes, one must manage this transition phase with care and, we suggest using a real-time monitoring system such as electrical impedance tomography.

INTRODUCTION

Total liquid ventilation (TLV), where dense liquid perfluorochemicals (PFC) are used to fill and ventilate the lungs, has promising properties for the management of the extremely immature neonate (1). Preterm infants exhibit surfactant deficiency at birth resulting in high surface tension and unstable alveoli with diffuse micro-atelectasis. Conventional gas mechanical ventilation typically used to support these infants generates ventilator-induced lung injury through heterogeneous ventilation (2), volutrauma (3) and inflammation (2, 4). It is also associated with the development of bronchopulmonary dysplasia, a chronic disease with long term morbidity (5). TLV use is motivated by evidence of a more homogenous lung recruitment (6, 7) and its potential as an efficient technique to remove pulmonary aspiration debris (8, 9). Moreover, PFCs have low surface tension, anti-inflammatory properties (10-12) and have been shown to promote lung growth (13, 14). TLV thus appears as an excellent candidate for bronchopulmonary dysplasia prevention in the most extreme preterm newborns (1), and for which animal studies have been positive to date (15-17).

The air-liquid interface appears to be completely eliminated during TLV, as gas is entirely evacuated in the ventilator expiratory arm and/or dissolved in PFC (1). A post-mortem animal study using CT-scan has indeed provided evidence that the dense PFC is distributed in the entire lung after a period of 1 hour of TLV (6). However, the time interval required to complete this transition is unknown and is potentially affected by the specific filling protocol used. One important safety consideration for TLV is a better understanding of the early events during the transition to TLV, especially regarding the fate of residual air in the non-dependent-lung regions. In our experience, the first few minutes of TLV are the most critical, where most of the instability in hemoglobin oxygen saturation is observed if the lungs are filled too slowly. On the other hand, a rapid insertion of PFC into air-filled lungs could potentially lead to air trapping and overdistention in the non-dependent lung regions, in turn inducing ventilator-induced lung injury. This is particularly important since, in the preterm infant population, even only a few high-volume ventilations at birth have been shown to negatively affect the lungs (18). We have also documented a progressive decline in end-expiratory and end-inspiratory pause pressure during the first few minutes of TLV suggesting an increase in lung compliance (7) and/or progressive decrease in total lung

volume from air evacuation. Finally, PFC volume must be progressively increased during the first minutes of TLV in order to avoid tracheal collapse during active expirations. After 5 to 10 minutes, the ventilation is more stable and requires fewer adjustments. These observations have motivated the present study.

Electrical impedance tomography (EIT) is a non-invasive technique which calculates rapid (4 to 50 images/sec) changing distribution of ventilation using low amplitude electrical current applied to surface electrodes (19). There is a linear relationship between change in impedance and total lung volume (20, 21). EIT has been successfully used to characterize lung volume during partial liquid ventilation (22), and has also been used to study lung perfusion by analyzing changes in thoracic impedance following the injection of a bolus of hypertonic saline contrast (23). EIT is thus a tool with the necessary temporal resolution to describe dynamic processes such as transition to liquid ventilation at bedside. Since PFC and air both have very low conductivity, they cannot be differentiated by EIT. Fortunately, the specific PFC used for this study (perflubron) is radio-opaque such that fluoroscopy can be used to complete the assessment of transition to TLV.

Given the above, our objective was to use EIT and fluoroscopy to ascertain lung recruitment and air evacuation within the first minutes of TLV in a neonatal lamb model of surfactant deficiency. We also aimed to assess how lung perfusion adapts to the distribution of the liquid tidal volume. Our overall goal is to gain insight into the transition phase of TLV in order to avoid ventilator-induced lung injury and assess the need to refine our filling approach.

MATERIAL AND METHODS

A total of 20 full-term newborn male lambs were used (3.4 ± 0.2 kg, 3.2 ± 0.5 days of age; 8 in the experimental group, 12 controls), brought to the research facility from a local breeder. The study was approved by the animal research ethics board of the Université de Sherbrooke (protocol # 401-16) and performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Anesthesia, Instrumentation and Induction of Surfactant Deficiency

Lambs ($n = 8$) were premedicated with ketamine (10 mg/kg IM) prior to percutaneous cannulation of the left jugular vein. They were intubated with a 4.5mm cuffed endotracheal tube and placed in supine position. Sixteen EIT electrodes were positioned around the thorax, covering the superior aspect of the posterior lobes. Gas ventilation was initiated (Servo-300; Siemens-Elema, Solna, Sweden) in a pressure-regulated mode, with a positive end-expiratory pressure of 6 cmH₂O and a peak inspiratory pressure adjusted to generate 7 ml/kg of tidal volume and a backup rate of 40 cycles/min. Hemoglobin saturation was continuously recorded by pulse oximetry (Radical, Masimo, Irvine, CA) with a probe at the base of the tail. Lambs were maintained under general anesthesia throughout the experiment using propofol 120 µg/kg/min and ketamine 1 mg/kg/h, along with a 10% dextrose solution at a rate of 6 ml/kg/h. They received a single IV dose of fentanyl 4 µg/kg before instrumentation. A 3 Fr catheter (PV2013L07, PiCCO catheter; Pulsion Medical System, Munich, Germany) was inserted into the right femoral artery to allow for continuous monitoring of systemic arterial pressure and blood gas measurements. Lung lavages with 10 ml/kg of warmed saline were performed to induce surfactant deficiency. They were repeated until PaO₂ reached a value of < 100 Torr under 100% FiO₂ for at least 20 minutes.

Total Liquid Ventilation Protocol

Our TLV filling protocol has been developed over the past few years. The lambs were disconnected from the gas ventilator for 5 s to allow the lung to deflate prior to initiation of TLV under fluoroscopic recording (lateral beam). The lungs were then filled with 25 ml/kg of perfluorooctyl bromide, also called perflubron, at 39°C (Exflur, Round Rock, TX) over 18 seconds, using the INOLIVENT-6 liquid ventilator prototype (24, 25). In our experience,

a slow filling over 20 seconds is well tolerated by subjects (no oxygen desaturation). We do not preoxygenate the lung to wash nitrogen out, as prolonged period of hyperoxia would not be acceptable for a premature infant, our targeted population, due to risks of oxidative stress. Volume-controlled, pressure-limited and time-cycled TLV was then initiated with a tidal volume of 11-14 ml/kg, a respiratory rate of 6-10 cycles/min, and an inspiratory to expiratory ratio of 1:2. End-expiratory PFC volume was progressively increased over the first five TLV cycles to 30 ml/kg (rate of 1 ml/kg/cycle, up from 25 ml/kg just after filling) in order to allow the first cycles to occur at lower lung volume while large volumes of air are being evacuated during expiration. Thereafter, small volumes of PFC (1 ml/kg) could be administered by the operator, through the ventilator control unit, as needed to avoid expiratory tracheal collapse (26) and compensate for PFC evaporation losses in the ventilator. Ventilation parameters were aimed at maintaining oxygen saturation $> 90\%$ and $\text{PaO}_2 > 60$ Torr, as well as arterial $\text{pH} > 7.20$ and PaCO_2 between 50-65 Torr (27). The INOLIVENT-6 ventilator prototype monitors both the inspiratory and expiratory pause pressures as well as the pressure during PFC movement in and out of the subject. EIT signals were recorded during the first 2h although lambs were subjected to TLV for a total of five hours. The lambs were then euthanized with one IV injection of 90 mg/kg pentobarbital.

Control groups

Two groups of controls were used for histological analysis only. A group of 7 lambs were subjected to the same insult (surfactant deficit) but were maintained under conventional gas ventilation for the entire length of the experiment. Initial ventilation parameters were adjusted to maintain blood gas within the same range as the TLV group, using a permissive hypercapnia approach (27). Another group of 5 newborn lambs were euthanized after venous cannulation and lung samples were taken as control for histological analysis as well (i.e. not subjected to mechanical ventilation or lung lavage).

Electrical Impedance Tomography monitoring

EIT uses multiple electrodes positioned around the thorax to reconstruct a 2D image of a transversal slice of the thorax based on the variation of the electrical impedance during ventilation. These images are generated multiple times per second (figure 1). Measurements

were taken with the Sigmatome II (École Polytechnique de Montréal, Montreal, Canada)(28) device using an applied current at 50 kHz, with an acquisition rate of 4.7 images/sec. Sixteen electrodes (Kendall 7605 Cloth electrodes, Covidien, Dublin, Ireland) were placed in a transversal plane around the thorax of the animals, behind the forelegs. The electrodes were covered with gel to improve contact. Two EIT recordings were made during the experiment: from 5 minutes before filling up to and including the first 10 minutes of TLV; and after 120 minutes of TLV.

EIT data were reconstructed using the GREIT algorithm (29), set to a noise figure of 0.5, and adapted to the Sigmatome II system and the lamb's thorax geometry as described below. The Sigmatome system acquires data using an adjacent stimulation and measurement protocol with 416 measurements per frame made after analog filtering of the data. The sensitivity matrix was adapted to account for this filter within the reconstruction algorithm. Reconstruction of a 2D “slice” at the electrode plane was calculated using a segmented lamb CT-based finite element model. Cross-sectional images of the lungs were generated from impedance variations from baseline. The baseline frame selected for the experiments was the one immediately before the subject was disconnected from the gas ventilator, before filling with PFC. The frames were divided into two equal zones (anterior, or non-dependent; and posterior, or dependent regions). The pixels within each of these two regions were summed and averaged over three respiratory cycles in order to measure the contribution of each section (figure 1).

Absolute changes in impedance values are reported as well as regional ventilation, expressed as a percentage of the global signal change (31). Measurements were taken at end-expiration. To assess tidal volume distribution, the impedance at end-expiration was subtracted from the end-inspiration value and divided by the total impedance in order to obtain a regional percentage of distribution. In this study, it is the relative change with respect to the ‘arbitrary’ reference impedance level that is analyzed as a proxy for total lung volume (19). Both the PFC used (perflubron) and air effectively have infinite resistivity with respect to tissue values and cannot be differentiated using EIT (our measurements show it has resistivity greater than 1 M Ω -m with both direct current and alternating current for

frequencies below 100 kHz). The saline solution used for lung lavage is immiscible in PFC. In bench impedance measurements, PFC was not affected by the injection of the saline solution and constant agitation of the fluids.

Various techniques have been developed to assess lung perfusion based on EIT. In this study, we used the variation of thoracic impedance with a central venous injection of hypertonic saline during an apnea to describe lung perfusion (23). Two-ml injections of hypertonic saline (7%) were administered during an expiratory pause during gas ventilation, and thereafter at 1, 5, 10 and 120 min of TLV to allow regional blood perfusion measurements. The choice of a 2 ml injection was based on a previous pilot study (32) that showed adequate impedance change to assess perfusion. The reference frame for this analysis was selected immediately before the injection, during apnea. After the injection, the frame with the widest transversal thoracic distribution of the contrast was used to assess impedance change associated with blood distribution. This method was used to avoid the early right ventricular first pass (23) of the contrast agent as much as possible. The distribution of the hypertonic contrast within the anterior and posterior regions of the lungs was then reported as a percentage of the global signal.

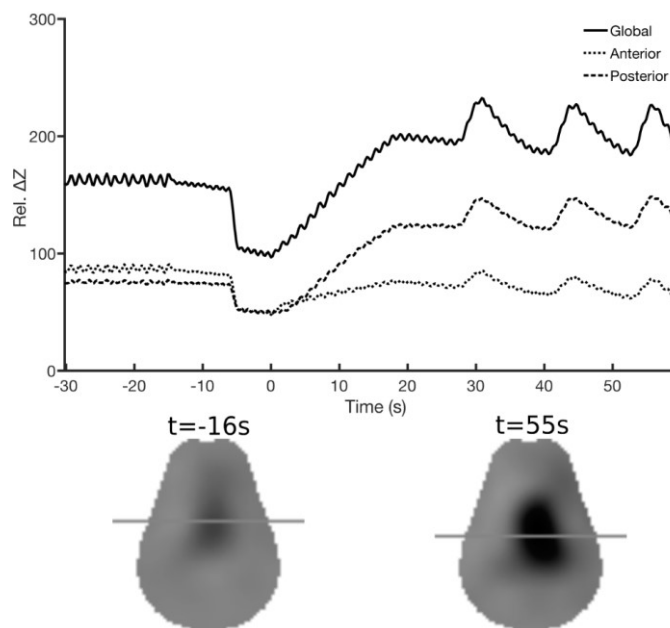


Figure 1. Electrical impedance tomography

Example of the EIT data collected from one lamb during filling with perflubron, which begins at time = 0s. The upper panel shows the average relative impedance change from the reference frame (Rel. ΔZ) for the pixels in the anterior (dotted line) and posterior (dashed line) lung regions during gas ventilation (-30 to -16 seconds) and total liquid ventilation (from 28 to 55 seconds). The solid line is the sum of these two lines. The lower panel shows the EIT images reconstructed to show the difference between the end-expiration and end-inspiration (i.e. proxy for tidal volume) during gas ventilation (left) and total liquid ventilation (right). The horizontal lines indicate the position of the vertical center of gravity of the reconstructed image amplitude and illustrate that liquid (vs. gas) ventilation has a larger component in the dependent lung.

Fluoroscopic Measurements of Perfluorooctyl Bromide (Perflubron) Distribution into the Lungs

Lateral beam fluoroscopic recording (model 718095 Philips BV Pulsera, Amsterdam, Netherlands) was performed at 15 frames/s for 30 s throughout the initial lung filling with PFC, then at 10 and 60 minutes of TLV. The initial settings were selected from a scout image (range 60 to 64 keV, typical current 3.55mA) for each subject but were subsequently

manually fixed to avoid variation throughout the protocols. Due to its radio-opacity, perflubron appears darker than surrounding lung tissue and can be monitored by mean grey values for the pixels within the region of interest (i.e. grey level range 0 to 4095, 0 being complete radio-opacity at the set parameters) using Fiji Image J software. An anteroposterior region of interest, located just caudally to the EIT electrodes, was manually divided into four equal-sized regions for analysis (60 pixels width, 16.8 mm; height dependent on anteroposterior diameter) (figure 3A). Electrodes used for EIT were usually not protruding in the regions of interest. However, if they were partly within the field, no special treatment was applied to the images. This should not affect the results as each region of interest was only compared to itself throughout the protocol.

Histological scoring for lung inflammation

Samples from the anterior middle lobe and posterior lower lobe region of the right lung were collected and fixed in formaldehyde 10 %. The tissues were then embedded in paraffin from which 5 μ m sections were prepared before hematoxylin/eosin staining. A histological score of lung inflammation, previously validated for the newborn lamb, was performed by a blinded pathologist (SM) (33). Four key components (septation thickness, hemorrhage, inflammation cell infiltration, epithelial sloughing) were assessed, each on a scale of 0 to 2 (total worst score of 8).

Variables and Statistical Analysis

The Friedman non-parametric test for repeated measures followed by the Wilcoxon signed-rank test were used for EIT and fluoroscopy data. Differences between the anterior and posterior regions were analyzed using the Mann-Whitney U test. The Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U test were used for histological scoring assessment. Data are reported as mean \pm SD unless specified otherwise. *Statistical analyses were performed using SPSS 19 (IBM, Armonk, NY).*

RESULTS

The eight lambs reached entry criteria after a mean of 7 ± 7 lung lavages. Half ($50 \pm 35\%$) of the instilled saline was recovered by suction. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ decreased from 274 ± 87 to 75 ± 19 Torr ($p < 0.001$) after the insult. Blood gases were severely altered ($\text{pH } 7.28 \pm 0.12$ vs. 7.10 ± 0.09 , $p = 0.001$; paCO_2 43 ± 7 vs. 60 ± 8 Torr, $p = 0.003$; HCO_3^- 19 ± 5 vs. 15 ± 3 mmol/l, $p = 0.02$) and remained relatively stable during TLV (at 2 hours of TLV: $\text{pH } 7.13 \pm 0.11$; PaCO_2 57 ± 4 Torr; HCO_3^- 16 ± 4 mmol/l, p values respectively 0.06, 0.29 and 0.08 when compared to post-insult values). However, PaO_2 improved during TLV (75 ± 19 vs. 129 ± 40 Torr, $p = 0.017$, after the insult and at 120 minutes of TLV, respectively). During the initial phases of TLV, pressures at end-inspiration and end-expiration decreased rapidly (table 1).

Monitoring of Lung Volume with Electrical Impedance Tomography

EIT signal was acquired for all 8 lambs in the TLV experimental group. Total lung volume decreased when the subjects were disconnected from the gas ventilator, just before filling the lungs with PFC ($p = 0.01$) (figure 2). With filling (25ml/kg), global impedance reached higher values than during gas ventilation ($+29 \pm 13\%$, $p = 0.01$). During the first few liquid breathing cycles, visible large gas bubbles were expelled through the endotracheal tube. Despite an increase in end-expiratory PFC volume left in the lungs during the first minute of TLV, from 25ml/kg to 30ml/kg, end-expiratory global impedance decreased slightly during this same time interval ($p = 0.02$), suggesting that more air is evacuated than PFC entering the lungs. Global impedance continued to decrease between the first and the tenth minute of TLV ($-24 \pm 17\%$, $p = 0.02$), stabilizing thereafter. The impedance signal was the same at 10 minutes and 120 min TLV, with a value similar to that measured during gas ventilation ($p = 0.4$).

The increase in total lung volume during the initial filling relied exclusively on the posterior, or dependent, lung regions. In the anterior regions, no significant change in volume was observed between gas ventilation and the end of lung filling with PFC. Moreover, the anterior impedance values measured one minute after TLV initiation were lower than during gas ventilation, although the difference did not reach statistical significance ($p = 0.05$). Conversely, lung volume in the posterior region increased by $70 \pm 28\%$ ($p = 0.01$) from gas

ventilation to the end of lung filling with PFC and remained stable thereafter (figure 2). The proportion of global signal attributed to the anterior regions of the lung decreased progressively from $56 \pm 4 \%$ during gas ventilation to $33 \pm 8 \%$ at five minutes of TLV ($p = 0.01$), remaining stable thereafter ($31 \pm 11\%$ at 120 min, $p = 0.7$).

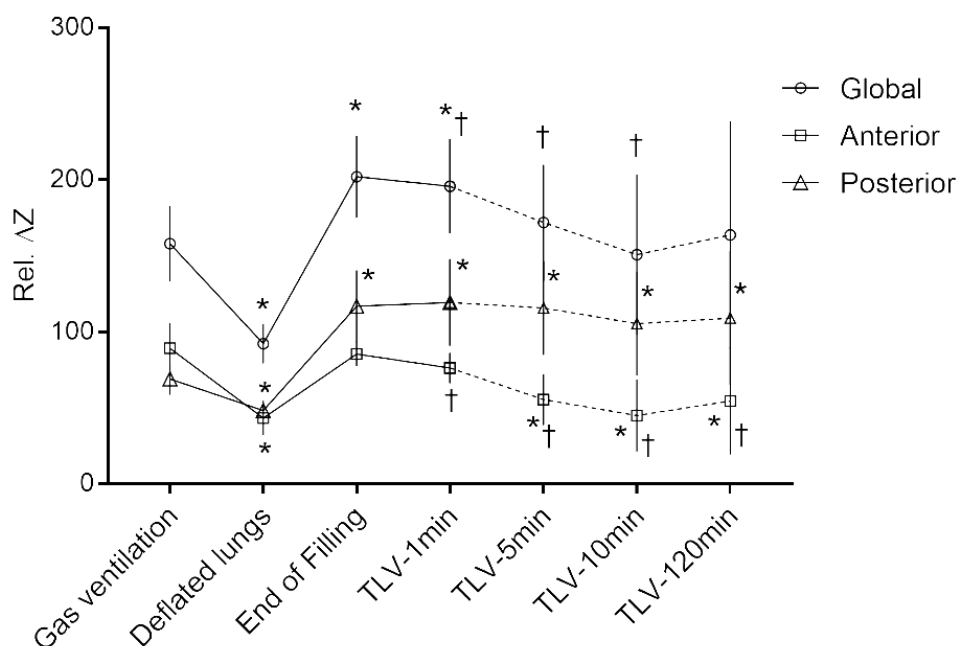


Figure 2. End-expiratory lung volumes assessed by electrical impedance tomography

Total and regional lung volumes (air + perflubron) assessed by electrical impedance tomography during the transition from gas to total liquid ventilation. The change in impedance relative to the reference value is indicated by the y-axis (see method section). A higher value on the Y-axis should be interpreted as a higher lung volume. * Different than during gas ventilation ($p < 0.05$). † Different from end-filling value, for timepoints after filling ($p < 0.05$). There was no significant difference between the 10-minute values and the 120-minute values for the three curves. Values are presented as mean \pm SD. Statistical analysis using Friedman test for repeated measures followed by Wilcoxon signed-rank test ($n = 8$). TLV: total liquid ventilation.

Table 1. Blood gas through the protocol.

Blood gas evolution through the protocol. Differences were first assessed with a Friedman test for repeated measures followed by a Wilcoxon signed-rank test (*if $p < 0.05$

when compared to baseline value, †if $p < 0.05$ when compared to post insult value, #when compared to TLV-30 min value).

TABLE 1 | Blood gas through the protocol.

	Baseline	Insult	TLV-30 min	TLV-120 min	p
PaO ₂	77.9 ± 26.1	74.7 ± 18.7	91.3 ± 52.9	128.9 ± 39.7*†	0.04
PaO ₂ /FiO ₂	274 ± 87	75 ± 19*	—	—	—
PaCO ₂ (mmHg)	42.7 ± 7.2	60.1 ± 7.8*	60.6 ± 6.4*	56.6 ± 3.8*	0.005
pH	7.28 ± 0.12	7.10 ± 0.09*	7.07 ± 0.11*	7.13 ± 0.11*#	<0.001
HCO ₃ ⁻ (mM)	18.9 ± 4.9	15.3 ± 3.2*	14.5 ± 4.1*	16.0 ± 3.6*#	0.02

Blood gas evolution through the protocol. Differences were first assessed with a Friedman test for repeated measures followed by a Wilcoxon signed-rank test (*if $p < 0.05$ when compared to baseline value, †if $p < 0.05$ when compared to post insult value, #when compared to TLV-30 min value).

Table 2. Ventilation parameters through the protocol

Gas ventilation parameters, at baseline and after the insult, are reported for 8 animals and compared using a Wilcoxon signed-rank test. Liquid tidal volume (Vt), respiratory rate (RR), end-expiratory pause pressure (EIPP) could only be recorded in 7 subjects and end-inspiratory pause pressure (EIPP) in 6 during total liquid ventilation (TLV) due to technical problems. Differences for total liquid ventilation parameters were assessed with a Friedman test for repeated measures followed by a Wilcoxon signed-rank test (* if $p < 0.05$ when compared to TVL-1min value, † if $p < 0.05$ when compared to TVL-30min value). Data are presented as mean ± SD. PIP: peak inspiratory pressure during gas ventilation. PEEP: positive end-expiratory pressure during gas ventilation.

TABLE 2 | Ventilation parameters through the protocol.

	Baseline	Insult	p	TLV-1 min	TLV-30 min	TLV-120 min	p
Vt (ml/kg)	6.6 ± 1.3	6.2 ± 2.4	0.5	12.4 ± 0.2	13.6 ± 1.0*	14.6 ± 1.3*†	0.03
RR (/min)	49 ± 13	51 ± 6.1	0.3	6.7 ± 0.6	9.3 ± 0.7*	8.8 ± 0.5*	0.002
PIP/EIPP (cmH ₂ O)	14.5 ± 1.7	18.3 ± 2.3	0.04	17.0 ± 2.6	14.7 ± 2.3*	11.8 ± 3.2*†	0.002
PEEP/EIPP (cmH ₂ O)	5.1 ± 0.6	6.6 ± 2.2	0.02	12.2 ± 2.0	4.2 ± 3.0*	0.7 ± 4.1*†	0.001

Fluoroscopic assessment of PFC distribution at end-expiration

Fluoroscopic sequences were obtained for 6 of 8 lambs due to the availability of the equipment. The most anterior lung region filled slowly while the other regions (mid-anterior, mid-posterior and posterior) received most of the initial 25ml/kg PFC filling (figure 3A and 3B). The two anterior (anterior and mid-anterior) regions filled significantly between the end of filling and 60 minutes of TLV. It is however not clear if significant filling occurred after

the first 10 minutes (1524 ± 467 vs. 1278 ± 372 mean grey value at 10 min vs. 60 minutes for the most anterior region, $p = 0.1$).

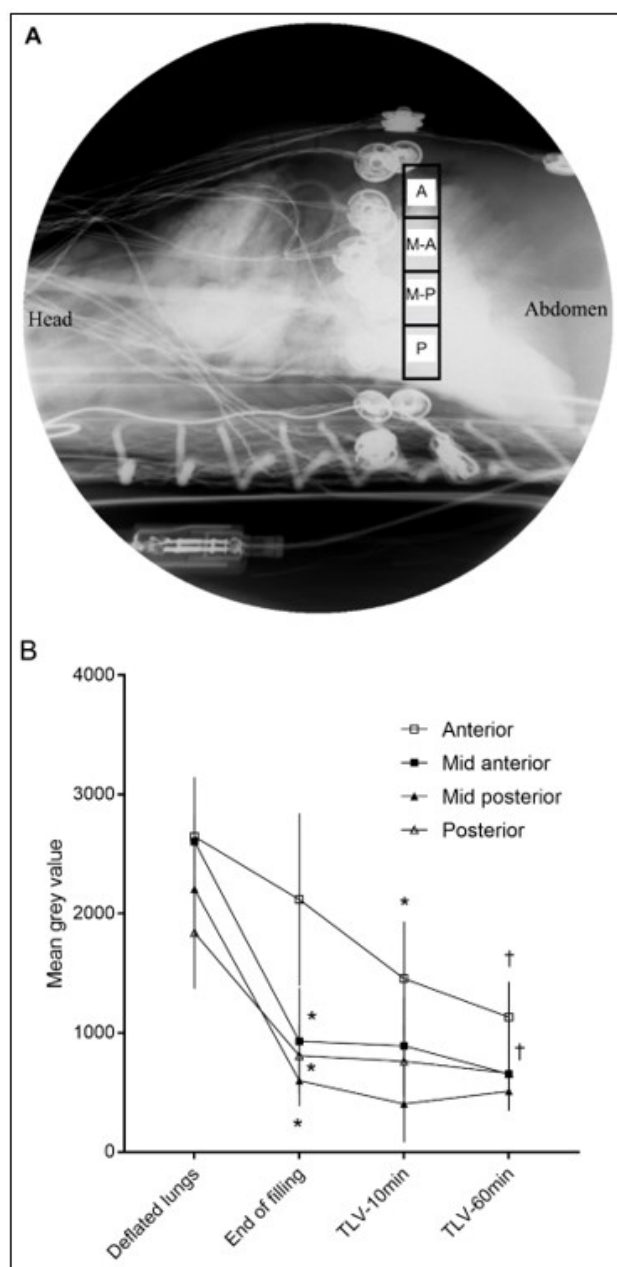


Figure 3. Mean grey values obtained by fluoroscopy

A. Fluoroscopic image of the thorax (lateral beam) showing the 4 regions of interest (A: anterior; M-A: mid-anterior; M-P: mid-posterior; P: posterior) for which a mean grey value was measured (note: image was converted from black to white given that most clinicians are

accustomed to associate white with radio-opacity). B. Absolute mean grey value (scale 0 = complete radio-opacity, to 4095 = completely radiolucent) throughout the protocol. A decrease in mean grey value represents an accumulation of perflubron. Values are presented as mean \pm SD, $n = 6$. Statistical analysis using Friedman test for repeated measures followed by Wilcoxon signed-rank test. *First timepoint at which mean grey value differs from the deflated lung value ($p < 0.05$). [†]Compared to end of filling, the mid-anterior and the anterior region continue to accumulate PFC at 1 hour of liquid ventilation ($p < 0.05$).

Distribution of tidal volume and lung perfusion

During gas ventilation, most of the tidal volume was directed to the anterior half of the lungs but this changed rapidly with TLV ($66 \pm 8\%$ to $46 \pm 12\%$, during gas ventilation and at 1 min after TLV initiation, respectively, $p = 0.02$). The distribution of tidal volume was stable thereafter ($47 \pm 19\%$ at 120 minutes of TLV, $p = 0.2$ when compared to the 1-minute value). Perfusion exhibited a different pattern. For this analysis, data from only 7 animals could be used because recordings from one animal were of poor quality during the saline injection. During gas ventilation, only $46 \pm 17\%$ of the EIT signal change occurred in the anterior region with hypertonic saline injection. PFC filling was associated with a non-significant increase in the anterior distribution of the perfusion signal to $53 \pm 6\%$ ($p = 0.4$ vs. gas ventilation), which remained stable thereafter ($54 \pm 4\%$ at 2 hours of TLV). However, considering the reciprocal changes in tidal volume distribution, the ventilation-to-perfusion relationship changed considerably with TLV ($p = 0.004$) (figure 4).

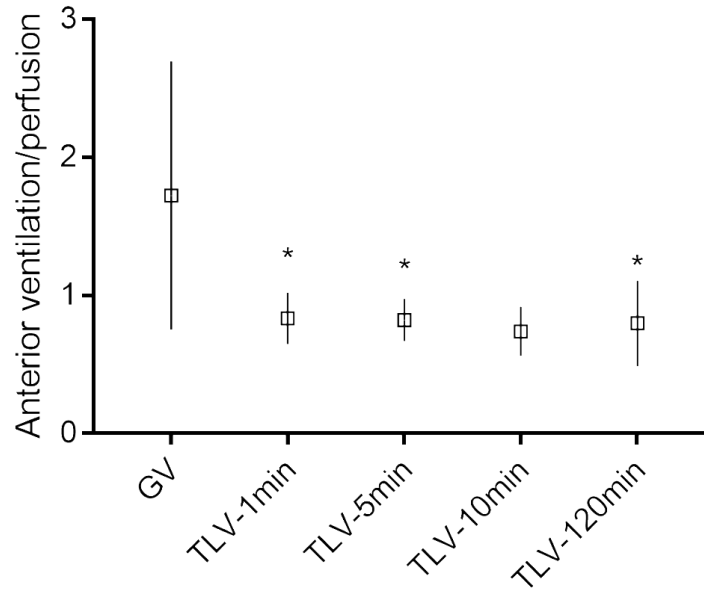


Figure 4. Anterior lung ventilation-perfusion ratio

In this figure, the electrical impedance tomography proxy for the tidal volume is divided by the proxy for the perfusion (for anterior lung regions, the ratio is shown on the Y-axis). Although this is not an exact measurement of the ventilation-perfusion ratio, it provides clear evidence that this ratio is affected by total liquid ventilation as soon as it is initiated. The proxy used to assess the anterior tidal volume is the impedance change during inspiration in the anterior regions divided by the global lung impedance change during inspiration (i.e. approximating the percentage of tidal volume going to the anterior lung regions). The proxy for perfusion was obtained by injecting a bolus of hypertonic saline during an apnea (i.e. impedance variation in the anterior lung regions divided by the global change in impedance). Considering the known ventilation-perfusion anomalies in this pathologic model, these changes probably positively affect ventilation-perfusion coupling. GV: gas ventilation; TLV: total liquid ventilation. *Different from initial value during gas ventilation, analyzed by Friedman test for repeated measures (GV, 1min, 5min and 120min) followed by Wilcoxon signed-rank test, $n = 7$, $p < 0.05$. Recordings from one animal were of poor quality during the saline injection and were not analyzed. The 10-minute value was excluded from the analysis as only four animals were recorded. The posterior regions have the exact opposite pattern and are thus not shown in the figure.

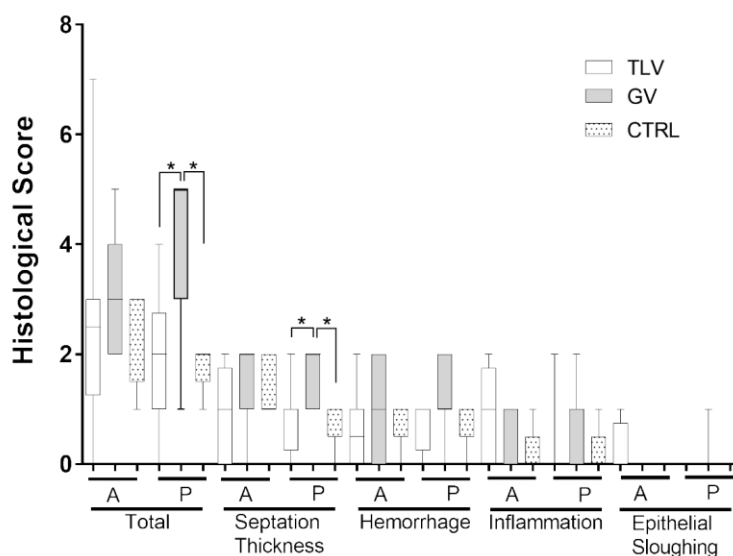


Figure 5. Pathological assessment of lung inflammation

Three groups were used to assess the impact of total liquid ventilation in this pathological neonatal model, using the Hillman histological score. TLV (total liquid ventilation, $n = 8$) represents the group of lambs studied with electrical impedance tomography and fluoroscopy while CTRL represents a control group where lambs were not mechanically ventilated or subjected to the insult ($n = 5$). The lambs from the gas ventilation group (GV, $n = 7$) were subjected to the same insult as the TLV group but were maintained under conventional gas ventilation for the entire duration of the experiment. A: anterior regions of the lung; P: posterior lung regions. *Significantly different ($p < 0.05$). One animal from the TLV group was only subjected to TLV for 3 hours due to a technical problem with the liquid ventilator prototype. The exclusion of this subject does not affect the statistical results presented. A Kruskal Wallis test followed by Mann-Whitney U test was used.

Histological scoring of lung damage

No significant changes in the Hillman histological score were found between TLV lambs and control lambs (figure 5) despite the insult. Conversely, the score was higher (i.e. more damage) in the group subjected to the insult but maintained on conventional gaseous ventilation. This last group received the same number of lung lavages before they reached the entry criteria (6.9 ± 5 , $p = 0.7$) with a similar deterioration of blood gases ($\text{pH } 7.26 \pm 0.05$

vs. 7.13 ± 0.09 , $p = 0.02$; paCO_2 41 ± 9 vs. 57 ± 10 Torr, $p = 0.03$; HCO_3^- 18 ± 4 vs. 16 ± 4 mmol/l, $p = 0.08$, for baseline and post-insult values, respectively) and $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (284 ± 124 vs. 70 ± 13 , $p = 0.02$). These animals were maintained under invasive conventional mechanical ventilation and peak inspiratory pressures were adjusted to maintain adequate tidal volumes after the insult (peak inspiratory pressure 16 ± 3 vs. 21 ± 3 cmH₂O, $p = 0.02$; tidal volume 6.5 ± 1.3 vs. 5.6 ± 1.2 , $p = 0.06$). TLV was mostly beneficial to the dependent lung regions when compared to subjects supported with gas ventilation only.

DISCUSSION

The current project was aimed at gaining insight into the transition phase of TLV in order to avoid ventilator-induced lung injury. We had a specific concern regarding potential air trapping in the non-dependent lung regions during this transition. In our neonatal lamb model, filling is a dynamic process involving a short period of increased total lung volume secondary to the rapid recruitment of the dependent lung regions. Pathological examination showed that TLV was protective for these same regions. The non-dependent lung regions were progressively filled with PFC but remained under the volume recorded during gas ventilation, strongly suggesting overdistention is not occurring. The distribution of the tidal liquid volume, from the start of TLV and thereafter, was more homogenous than during gas ventilation. TLV had an immediate, likely beneficial effect on ventilation/perfusion relationship. Overall, our rapid filling approach was very well tolerated by the animals and results from EIT analysis are reassuring.

As expected, based on the existing literature on partial liquid ventilation (34, 35), PFC initially filled the dependent lung regions. Both mathematical models (36) and post-mortem assessments had suggested a homogenous recruitment of the lung by PFC (6, 37) at some point after transition. What was unclear was the sequence of events that would lead to stable TLV and elimination of the air-to-liquid interface. Dealing with residual lung air during transition to TLV has been a concern since the early days of this technology. In 1974, Shaffer suggested the use of positioning, thoracic manipulation and nitrogen removal through hyperventilation with 100% oxygen to deal with this issue (38), an approach that would be unacceptable for the preterm infant due to concerns related to oxidative stress. There is in fact very limited evidence suggesting the superiority of a specific filling protocol. In the present study, we show that the anterior regions of the lungs were progressively recruited by PFC over the first 10 minutes of TLV. Anterior regions had a similar volume to that during gas ventilation just after filling but quickly decreased to lower values as early as 1 minute after the initiation of TLV cycling. The gain in total lung volume is thus entirely attributed to recruitment of the dependent lung regions in our full-term ovine model of respiratory distress, in agreement with the literature (7, 39). Importantly, these regions demonstrate better histological scores with TLV. We speculate that alveolar recruitment and

avoidance of shear stress induced by repeated reopening injury are protective to these regions, known for their tendency to atelectasis (40). Regional lung volume assessed by EIT as well as the amount of PFC assessed by fluoroscopy in the non-dependent lung regions appeared to be relatively stable between 10 minutes and 120 minutes of TLV, suggesting that most of the transition was completed by 10 minutes of TLV. Continuing slow replacement of air by PFC in the anterior regions after 10 minutes is however not excluded as this study was not powered to detect very small differences in mean grey values during fluoroscopy.

The present study also demonstrates for the first time that tidal volume, and not only lung recruitment measured at end-expiration, was more homogeneously distributed during TLV as compared to gas ventilation. The redistribution of blood flow to the non-dependent regions, described in previous partial liquid ventilation studies (41-43), was in this instance modest and did not reach significance. However, given the opposite effects on tidal volume distribution and blood flow, TLV initiation immediately affected the ventilation-perfusion coupling and was stable thereafter. Studies on preterm infants have shown that a larger proportion of gas ventilation is distributed to the non-dependent lung regions (44) whereas pulmonary blood flow distribution in mechanically-ventilated subjects is predominantly directed in the dependent regions (43). Infants with respiratory distress syndrome thus have a significant ventilation-perfusion mismatch (45, 46). Our findings suggest TLV could positively affect such ventilation-perfusion mismatch in this population. However, the latter will need to be evaluated properly as our assessment is based on proxies, and thus we cannot conclude at this point that the optimal ventilation-perfusion ratio obtained herein with EIT is indeed the ultimate optimal value.

Limitations

The choice of a term neonatal lamb model of induced surfactant deficiency, as a preliminary step before moving to the preterm lamb model, was made because of its robustness, availability and lower cost. However, repeated lung lavage using saline is a recognized model of induced surfactant deficiency (47). One could argue that since we only recovered approximately half of the saline injected into the lung, the residual saline could

have affected our results. We believe the very significant increase in impedance observed in the dependent lung regions during PFC filling provides evidence that residual saline did not prevent lung recruitment in these regions. Hypertonic saline injection could have affected electrical properties of the tissue, at least during a few heart beats, decreasing the global impedance (i.e. and thus suggesting lower volumes). The 5-minute and 10-minute data points would have been the most sensitive to such bias. To limit the effects of this phenomenon, the ventilation EIT signal was systematically recorded prior to the hypertonic injection. We believe our recording at 2 hours, showing a similar lung volume as that during gas ventilation, was probably not significantly affected by the saline injection at 10 minutes. We additionally chose to present some of the EIT data as a percentage of the global signal in order to negate any potential effect of hypertonic injection on regional impedance recordings.

CONCLUSION

Filling the lungs with PFC involves rapid (i.e. dependent lung region recruitment, ventilation-perfusion coupling) and slow phenomena (i.e. non-dependent lung PFC filling and air evacuation) occurring over at least 10 minutes. The findings herein provide reassuring evidence that no damageable alveolar overdistention resulted from our filling protocol.

Acknowledgments

The authors would like to thank Jean-François Beaudoin and the ‘Centre d’imagerie moléculaire de Sherbrooke’ for help with fluoroscopy in this study.

Contributions

Original idea: EFP, PM, JPP, RT, AA; experimentations: MS, CFC, SS, CB, MN, EFP; data collection, analysis and interpretation: MS, CB, SS, AA, RT, EFP, MN, CFC, SM, PM, JPP; manuscript: MS, SS, CB, AA, CFC, MN, SM, PM, RT, JPP, EFP.

Disclosure

Philippe Micheau, Mathieu Nadeau and Jean-Paul Praud are co-inventors of patents related to the ventilator prototype used for this study (Apparatus for conducting total liquid ventilation with control of residual volume and ventilation cycle profile, US 7,726,311 B2,

EP 1 424 090 B1, CA 2,451,261 AND Indirect measurement in a total liquid ventilation system, PCT/CA2014/205548 US 2016/0271348 A1). Renaud Tissier is inventor of a patent related to the use of liquid ventilation (Method for treatment of a body of a mammal in cardiac arrest, US 9,439,804, B2).

REFERENCES

1. Wolfson MR, Shaffer TH. Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: ventilation and beyond. *Paediatric respiratory reviews*. 2005 Jun;6(2):117-27. PubMed PMID: 15911457. Epub 2005/05/25. eng.
2. Ramos LM NT, Sanchez-Esteban J. Invasive mechanical ventilation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. In: Bhandari V, editor. *Bronchopulmonary Dysplasia*: Humana Press; 2016. p. 27-54.
3. Hernandez LA, Peevy KJ, Moise AA, Parker JC. Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits. *J Appl Physiol* (1985). 1989 May;66(5):2364-8. PubMed PMID: 2745302. Epub 1989/05/01. eng.
4. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2006 Oct;11(5):354-62. PubMed PMID: 16702036. Epub 2006/05/17. eng.
5. Gough A, Spence D, Linden M, Halliday HL, McGarvey LP. General and respiratory health outcomes in adult survivors of bronchopulmonary dysplasia: a systematic review. *Chest*. 2012 Jun;141(6):1554-67. PubMed PMID: 22116801. Epub 2011/11/26. eng.
6. Hirschl RB, Overbeck MC, Parent A, Hernandez R, Schwartz S, Dosanjh A, et al. Liquid ventilation provides uniform distribution of perfluorocarbon in the setting of respiratory failure. *Surgery*. 1994 Aug;116(2):159-67; discussion 67-8. PubMed PMID: 8047981. Epub 1994/08/01. eng.
7. Tooley R, Hirschl RB, Parent A, Bartlett RH. Total liquid ventilation with perfluorocarbons increases pulmonary end-expiratory volume and compliance in the setting of lung atelectasis. *Crit Care Med*. 1996 Feb;24(2):268-73. PubMed PMID: 8605800. Epub 1996/02/01. eng.

8. Foust R, 3rd, Tran NN, Cox C, Miller TF, Jr., Greenspan JS, Wolfson MR, et al. Liquid assisted ventilation: an alternative ventilatory strategy for acute meconium aspiration injury. *Pediatr Pulmonol.* 1996 May;21(5):316-22. PubMed PMID: 8726157. Epub 1996/05/01. eng.

9. Avoine O, Bosse D, Beaudry B, Beaulieu A, Albadine R, Praud JP, et al. Total liquid ventilation efficacy in an ovine model of severe meconium aspiration syndrome. *Crit Care Med.* 2011 May;39(5):1097-103. PubMed PMID: 21317652. Epub 2011/02/15. eng.

10. Khalighi Z, Rahmani A, Cheraghi J, Ahmadi MR, Soleimannejad K, Asadollahi R, et al. Perfluorocarbon attenuates inflammatory cytokines, oxidative stress and histopathologic changes in paraquat-induced acute lung injury in rats. *Environmental toxicology and pharmacology.* 2016 Mar;42:9-15. PubMed PMID: 26766533. Epub 2016/01/15. eng.

11. Rotta AT, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury. *Crit Care Med.* 1998 Oct;26(10):1707-15. PubMed PMID: 9781729. Epub 1998/10/22. eng.

12. Thomassen MJ, Buhrow LT, Wiedemann HP. Perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Crit Care Med.* 1997 Dec;25(12):2045-7. PubMed PMID: 9403756. Epub 1997/12/24. eng.

13. Herber-Jonat S, Vuckovic A, Mittal R, Hilgendorff A, Jani JC, Flemmer AW. Intrapulmonary instillation of perflurooctylbromide improves lung growth, alveolarization, and lung mechanics in a fetal rabbit model of diaphragmatic hernia. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies.* 2014 Nov;15(9):e379-88. PubMed PMID: 25370070. Epub 2014/11/06. eng.

14. Nobuhara KK, Fauza DO, DiFiore JW, Hines MH, Fackler JC, Slavin R, et al. Continuous intrapulmonary distension with perfluorocarbon accelerates neonatal (but not adult) lung growth. *Journal of pediatric surgery*. 1998 Feb;33(2):292-8. PubMed PMID: 9498405. Epub 1998/03/14. eng.

15. Wolfson MR, Greenspan JS, Deoras KS, Rubenstein SD, Shaffer TH. Comparison of gas and liquid ventilation: clinical, physiological, and histological correlates. *J Appl Physiol* (1985). 1992 Mar;72(3):1024-31. PubMed PMID: 1568956. Epub 1992/03/01. eng.

16. Cox C, Stavis RL, Wolfson MR, Shaffer TH. Long-term tidal liquid ventilation in premature lambs: physiologic, biochemical and histological correlates. *Biol Neonate*. 2003;84(3):232-42. PubMed PMID: 14504447. Epub 2003/09/25. eng.

17. Degraeuwe PL, Thunnissen FB, Jansen NJ, Dormaar JT, Dohmen LR, Blanco CE. Conventional gas ventilation, liquid-assisted high-frequency oscillatory ventilation, and tidal liquid ventilation in surfactant-treated preterm lambs. *The International journal of artificial organs*. 2000 Nov;23(11):754-64. PubMed PMID: 11132020. Epub 2000/12/29. eng.

18. Bjorklund LJ, Ingimarsson J, Curstedt T, John J, Robertson B, Werner O, et al. Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatric research*. 1997 Sep;42(3):348-55. PubMed PMID: 9284276. Epub 1997/09/01. eng.

19. Frerichs I, Amato MB, van Kaam AH, Tingay DG, Zhao Z, Grychtol B, et al. Chest electrical impedance tomography examination, data analysis, terminology, clinical use and recommendations: consensus statement of the TRanslational EIT developmeNt stuDy group. *Thorax*. 2017 Jan;72(1):83-93. PubMed PMID: 27596161. Pubmed Central PMCID: PMC5329047. Epub 2016/09/07. eng.

20. Adler A, Amyot R, Guardo R, Bates JH, Berthiaume Y. Monitoring changes in lung air and liquid volumes with electrical impedance tomography. *J Appl Physiol* (1985). 1997 Nov;83(5):1762-7. PubMed PMID: 9375349. Epub 1998/01/07. eng.

21. Roth CJ, Ehrl A, Becher T, Frerichs I, Schittny JC, Weiler N, et al. Correlation between alveolar ventilation and electrical properties of lung parenchyma. *Physiological measurement*. 2015 Jun;36(6):1211-26. PubMed PMID: 26008964. Epub 2015/05/27. eng.

22. Wolf GK, Grychtol B, Boyd TK, Zurakowski D, Arnold JH. Regional overdistension identified with electrical impedance tomography in the perflubron-treated lung. *Physiological measurement*. 2010 Aug;31(8):S85-95. PubMed PMID: 20647621. Epub 2010/07/22. eng.

23. Borges JB, Suarez-Sipmann F, Bohm SH, Tusman G, Melo A, Maripuu E, et al. Regional lung perfusion estimated by electrical impedance tomography in a piglet model of lung collapse. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Jan;112(1):225-36. PubMed PMID: 21960654. Epub 2011/10/01. eng.

24. Nadeau M, Sage M, Kohlhauer M, Vandamme J, Mousseau J, Robert R, et al. Thermal Dynamics in Newborn and Juvenile Models Cooled by Total Liquid Ventilation. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2016 Jul;63(7):1483-91. PubMed PMID: 26552070. Epub 2015/11/10. eng.

25. Sage M, Nadeau M, Kohlhauer M, Praud JP, Tissier R, Robert R, et al. Effect of ultra-fast mild hypothermia using total liquid ventilation on hemodynamics and respiratory mechanics. *Cryobiology*. 2016 Aug;73(1):99-101. PubMed PMID: 27242031. Epub 2016/06/01. eng.

26. Bagnoli P, Acocella F, Di Giancamillo M, Fumero R, Costantino ML. Finite element analysis of the mechanical behavior of preterm lamb tracheal bifurcation during total liquid

ventilation. *Journal of biomechanics*. 2013 Feb 01;46(3):462-9. PubMed PMID: 23177086. Epub 2012/11/28. eng.

27. Ryu J, Haddad G, Carlo WA. Clinical effectiveness and safety of permissive hypercapnia. *Clinics in perinatology*. 2012 Sep;39(3):603-12. PubMed PMID: 22954272. Epub 2012/09/08. eng.

28. Robitaille N, Guardo R, Maurice I, Hartinger AE, Gagnon H. A multi-frequency EIT system design based on telecommunication signal processors. *Physiological measurement*. 2009 Jun;30(6):S57-71. PubMed PMID: 19491440. Epub 2009/06/06. eng.

29. Adler A, Arnold JH, Bayford R, Borsic A, Brown B, Dixon P, et al. GREIT: a unified approach to 2D linear EIT reconstruction of lung images. *Physiological measurement*. 2009 Jun;30(6):S35-55. PubMed PMID: 19491438. Epub 2009/06/06. eng.

30. Lines AL, Davey MG, Harding R, Hooper SB. Effect of increased lung expansion on surfactant protein mRNA levels in lambs. *Pediatric research*. 2001 Dec;50(6):720-5. PubMed PMID: 11726730. Epub 2001/12/01. eng.

31. Frerichs I, Dargaville PA, van Genderingen H, Morel DR, Rimensberger PC. Lung volume recruitment after surfactant administration modifies spatial distribution of ventilation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006 Oct 1;174(7):772-9. PubMed PMID: 16840739. Epub 2006/07/15. eng.

32. Adler A, Fortin-Pellerin E, Nadeau M, Vandamme J, Mousseau J, Micheau P, et al. EIT monitoring of the liquid-ventilated lung. *International Conference on Electrical Bio-Impedance and Electrical Impedance Tomography*; June 19-23; Stockholm, Sweden 2016. p. 168.

33. Hillman NH, Kallapur SG, Pillow JJ, Moss TJ, Polglase GR, Nitsos I, et al. Airway injury from initiating ventilation in preterm sheep. *Pediatric research*. 2010 Jan;67(1):60-5. PubMed PMID: 19816239. Pubmed Central PMCID: PMC2795027. Epub 2009/10/10. eng.

34. Quintel M, Hirschl RB, Roth H, Loose R, van Ackern K. Computer tomographic assessment of perfluorocarbon and gas distribution during partial liquid ventilation for acute respiratory failure. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Jul;158(1):249-55. PubMed PMID: 9655737. Epub 1998/07/09. eng.

35. Miller TF, Milestone B, Stern R, Shaffer TH, Wolfson MR. Effects of perfluorochemical distribution and elimination dynamics on cardiopulmonary function. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2001 Mar;90(3):839-49. PubMed PMID: 11181591. Epub 2001/02/22. eng.

36. Tarczy-Hornoch P, Hildebrandt J, Jackson JC. Gravitational effects on volume distribution in a model of partial and total liquid ventilation. *Respiration physiology*. 2000 Apr;120(2):125-38. PubMed PMID: 10773243. Epub 2000/04/25. eng.

37. Wolfson MR, Tran N, Bhutani VK, Shaffer TH. A new experimental approach for the study of cardiopulmonary physiology during early development. *J Appl Physiol (1985)*. 1988 Sep;65(3):1436-43. PubMed PMID: 3182511. Epub 1988/09/01. eng.

38. Shaffer TH, Moskowitz GD. Demand-controlled liquid ventilation of the lungs. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1974 Feb;36(2):208-13. PubMed PMID: 4811379. Epub 1974/02/01. eng.

39. Gauger PG, Overbeck MC, Chambers SD, Cailipan CI, Hirschl RB. Partial liquid ventilation improves gas exchange and increases EELV in acute lung injury. *J Appl Physiol (1985)*. 1998 May;84(5):1566-72. PubMed PMID: 9572800. Epub 1998/06/06. eng.

40. Bhatia R, Davis PG, Tingay DG. Regional Volume Characteristics of the Preterm Infant Receiving First Intention Continuous Positive Airway Pressure. *The Journal of pediatrics*. 2017 Aug;187:80-8 e2. PubMed PMID: 28545875. Epub 2017/05/27. eng.

41. Doctor A, Ibla JC, Grenier BM, Zurakowski D, Ferretti ML, Thompson JE, et al. Pulmonary blood flow distribution during partial liquid ventilation. *J Appl Physiol* (1985). 1998 May;84(5):1540-50. PubMed PMID: 9572797. Epub 1998/06/06. eng.

42. Harris RS, Willey-Courand DB, Head CA, Galletti GG, Call DM, Venegas JG. Regional VA, Q, and VA/Q during PLV: effects of nitroprusside and inhaled nitric oxide. *J Appl Physiol* (1985). 2002 Jan;92(1):297-312. PubMed PMID: 11744673. Epub 2001/12/18. eng.

43. Morris KP, Cox PN, Mazer CD, Frndova H, McKerlie C, Wolfe R. Distribution of pulmonary blood flow in the perfluorocarbon-filled lung. *Intensive Care Med*. 2000 Jun;26(6):756-63. PubMed PMID: 10945394. Epub 2000/08/17. eng.

44. Riedel T, Kyburz M, Latzin P, Thamrin C, Frey U. Regional and overall ventilation inhomogeneities in preterm and term-born infants. *Intensive Care Med*. 2009 Jan;35(1):144-51. PubMed PMID: 18810387. Epub 2008/09/24. eng.

45. Billman D, Nicks J, Schumacher R. Exosurf rescue surfactant improves high ventilation-perfusion mismatch in respiratory distress syndrome. *Pediatr Pulmonol*. 1994 Nov;18(5):279-83. PubMed PMID: 7898965. Epub 1994/11/01. eng.

46. Hand IL, Shepard EK, Krauss AN, Auld PA. Ventilation-perfusion abnormalities in the preterm infant with hyaline membrane disease: a two-compartment model of the neonatal lung. *Pediatr Pulmonol*. 1990;9(4):206-13. PubMed PMID: 2124345. Epub 1990/01/01. eng.

47. Merz U, Klosterhalfen B, Kellinghaus M, Peschgens T, Pluschke S, Hoernchen H. Effects of single and multiple doses of perfluorocarbon in comparison with continuous

partial liquid ventilation on gas exchange and lung pathology in newborn surfactant-depleted pigs. Crit Care Med. 2001 Mar;29(3):645-51. PubMed PMID: 11373437. Epub 2001/05/25. eng.

Article 3: Effect of low versus high tidal-volume total liquid ventilation on pulmonary inflammation

5.3.1 Avant-propos

Auteurs : Sage M, See W, Nault S, Morin C, Michalski C, Chabot C, Marouan S, Lavoie M. P, Micheau P, Praud J-P et Fortin Pellerin E.

Statut de l'article : Publié (PMID 32625110)

Journal : *Frontiers in Physiology*, 2020

Contributions:

Pour cet article, j'ai participé à la majorité des étapes menant à sa rédaction incluant les expérimentations chez tous les agneaux, l'analyse des données et l'écriture du manuscrit sous la supervision de mes directeurs de recherche. Implication : 80%.

5.3.2 Résumé

Les études sur des modèles animaux ont suggéré que la ventilation liquidienne totale (VLT) engendrait moins de dommage pulmonaire induit par la ventilation (VILI) que la ventilation mécanique gazeuse. Cependant, les paramètres optimaux pour limiter l'inflammation en VLT demeurent inconnus. L'objectif était de comparer l'inflammation pulmonaire suivant l'utilisation d'un petit V_T (L- V_T) ou d'un grand V_T (H- V_T) en VLT et d'évaluer l'impact sur le sevrage jusqu'en respiration spontanée. Seize agneaux nouveau-nés à terme ont été anesthésiés et randomisés dans les groupes petit V_T (V_T initial = 10 ml/kg et FR à 10/min) ou grand V_T (V_T initial = 20 ml/kg et RR à 5/min). Cinq agneaux ont été utilisés à titre de contrôles non ventilés. Après 4 heures de VLT en position dorsale, les agneaux ont été sevrés en position ventrale pour une durée de 4 heures, après laquelle le niveau de support respiratoire a été comparé. Les régions pulmonaires antérieures (non-dépendantes en VLT) et postérieures (dépendantes en VLT) ont été étudiées par l'obtention d'un score histologique et par qRT-PCR pour mesurer l'expression des gènes de l'*IL1B*, *IL6* et *TNF* et de 12 autres gènes impliqués dans le VILI. Tous les agneaux sauf un ont été extubés avec succès dans les 2 premières heures après la VLT (72 ± 26 min vs. 63 ± 25 , $p = 0,5$) avec des FiO_2 similaires à 4 heures post-VLT (27 ± 6 % vs. 33 ± 7 %, $p = 0,3$) entre les groupes L- V_T et H- V_T , respectivement. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les scores histologiques des deux groupes expérimentaux bien que les deux aient obtenu un score légèrement supérieur aux agneaux contrôles. Le groupe L- V_T présentait plus d'expression l'*IL1B* que le group H- V_T , autant dans les régions antérieures ($2,8 \pm 1,5$ vs. $1,3 \pm 0,4$, $p = 0,02$) que postérieures ($3,0 \pm 1,0$ vs. $1,1 \pm 0,3$ $p = 0,002$). Aucune différence significative n'a été trouvée entre l'expression des gènes de l'*IL6* et du *TNF*. Les analyses secondaires qualitatives ont montré que le groupe L- V_T était associé à un profil d'expression de gènes inflammatoires plus pathologique. En conclusion, aucun avantage n'a été associé à l'utilisation d'un petit V_T , alors qu'il est associé à un profil d'expression génique plus inflammatoire.

5.3.3 Article 3

Effect of low versus high tidal-volume total liquid ventilation on pulmonary inflammation

Michaël Sage,¹ Wendy See,¹ Stéphanie Nault,¹ Christophe Morin,¹ Christina Michalski,^{2,3} Benoit Chabot,⁴ Sofia Marouan,⁵ Pascal M. Lavoie,^{2,3,6} Philippe Micheau,⁷ Jean-Paul Praud,^{1,8} and Étienne Fortin-Pellerin^{1,8*}

¹Department of Pharmacology/Physiology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

²BC Children's Hospital Research Institute and Department of Experimental Medicine, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

³ Department of Experimental Medicine, The University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

⁴Department of Microbiology and Infectiology; ⁵Department of Pathology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada;

⁶Department of Pediatrics, University of British Columbia, Vancouver, Canada

⁷Department of Mechanical Engineering; ⁸Department of Pediatrics, Université de Sherbrooke, Sherbrooke Canada.

The experiments were performed at the Université de Sherbrooke animal facility.

*** Correspondance:** Étienne Fortin-Pellerin, MD, MSc
 Université de Sherbrooke
 3001, 12e Avenue Nord, Sherbrooke, QC, Canada
 Tel: 819-346-1110, #70564 Fax: 819-564-5398
 email: etienne.fortin-pellerin@usherbrooke.ca

Keywords: Liquid ventilation, ventilator-induced lung injury, tidal volume, newborn lamb, transcriptome.

Running Title: Liquid tidal volume and inflammation

Funding: This work was funded by a grant from the Respiratory Health Network of the Fonds de recherche du Québec-Santé, the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, and the Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke.

Abstract:

Animal experiments suggest that total liquid ventilation (TLV) induces less ventilator-induced lung injury (VILI) than conventional mechanical gas ventilation. However, TLV parameters that optimally minimize VILI in newborns remain unknown. Our objective was to compare lung inflammation between low (L-V_T) and high (H-V_T) liquid tidal volume and evaluate impacts on the weaning process. Sixteen anesthetized and paralyzed newborn lambs were randomized in an L-V_T group (initial tidal volume of 10 mL/kg at 10/min) and an H-V_T group (initial tidal volume of 20 mL/kg at 5/min). Five unventilated newborn lambs served as controls. After four hours of TLV in the supine position, the lambs were weaned in the prone position for another four hours. The levels of respiratory support needed during the four hours post-TLV were compared. The anterior and posterior lung regions were assessed by a histological score and real-time quantitative PCR for *IL1B*, *IL6*, and *TNF* plus 12 other exploratory VILI-associated genes. All but one lamb were successfully extubated within two hours post-TLV (72 ± 26 min vs. 63 ± 25 min, $p = 0.5$) with similar FiO₂ at 4 hours post-TLV (27 ± 6 % vs. 33 ± 7 %, $p = 0.3$) between the L-V_T and H-V_T lambs. No significant differences were measured in histological inflammation scores between L-V_T and H-V_T lambs, although lambs in both groups exhibited slightly higher scores than the control lambs. The L-V_T group displayed higher *IL1B* mRNA expression than the H-V_T group in both anterior (2.8 ± 1.5 -fold increase vs. 1.3 ± 0.4 -fold increase, $p = 0.02$) and posterior lung regions (3.0 ± 1.0 -fold change increase vs. 1.1 ± 0.3 -fold increase, $p = 0.002$), respectively. No significant differences were found in *IL6* and *TNF* expression levels. Gene expression changes overall indicated that L-V_T was associated with a qualitatively distinct inflammatory gene expression profiles compared to H-V_T, which may indicate different clinical effects. In light of these findings, further mechanistic studies are warranted. In conclusion, we found no advantage of lower tidal volume use, which was in fact associated with a slightly unfavorable pattern of inflammatory gene expression.

INTRODUCTION

Despite major advances in care, respiratory support remains challenging for many infants hospitalized in the neonatal intensive care unit. Total liquid ventilation has been suggested as an alternative to conventional mechanical ventilation for various conditions affecting the neonate, such as children born with diaphragmatic hernia (Snoek et al., 2014), meconium aspiration syndrome (Avoine et al., 2011) or who are born extremely premature (Shaffer et al., 1999; Davidson and Berkelhamer, 2017). Total liquid ventilation (TLV) uses liquid perfluorochemicals (PFCs), such as perflubron (PFOB, perfluorooctyl bromide), together with a dedicated liquid ventilator. In comparison to conventional gas ventilation, this was shown to ameliorate tidal-volume distribution and to require less positive pressure, thus reducing VILI in animal models (Tooley et al., 1996; Wolfson et al., 2008; Avoine et al., 2011; Pohlmann et al., 2011; Sage et al., 2018b). Perflubron, the PFC used for this study, also has anti-inflammatory properties that could reduce VILI (Thomassen et al., 1997; Woods et al., 2000).

Over the past decade, our team has developed a liquid ventilator prototype that allows for precise control over pressures and flows delivered to the lungs (Robert et al., 2010; Sage et al., 2018a; Sage et al., 2018b). These advances have allowed for tighter control over the end-expiratory lung volume of PFC, mainly through prevention of tracheal collapse occurring when excessive negative pressure is applied during expiration. These repetitive tracheal collapses cause progressive accumulation and trapping of fluid in the lungs (Costantino et al., 2004; Bagnoli et al., 2007). Our most recent prototype, called INOLIVENT, can be used to refine ventilation algorithms and lung protective strategies during TLV (Nadeau et al., 2018; Sage et al., 2018a; Kohlhauser et al., 2019).

High tidal volumes with conventional gas ventilation have been especially cited as inducing greater VILI (Ciuffini et al., 2018; Farrell et al., 2018). Our ventilation algorithms allow higher respiratory rates and lower tidal volumes to be used, thus maintaining minute ventilation, while avoiding tracheal collapses (up to ~10 cycles/min compared to 3–6 cycles/min with previously published TLV prototypes)(Robert et al., 2007; Robert et al., 2009; Robert et al., 2010). The higher proportion of liquid tidal volume cycling within the anatomic dead space is however of particular concern in the context of low gas diffusion in PFC (Koen et al., 1988; Costantino and Fiore, 2001). To our knowledge, the effect of tidal

volume and respiratory rate on lung inflammation during TLV has not been thoroughly addressed. Jiang et al. (2016) showed that a tidal volume of 6 mL/kg was associated with lower transcription and plasma protein levels of IL-6 and IL-8 in piglets, compared to a higher tidal volume of 25 mL/kg during TLV (Jiang et al., 2016). The authors, however, had to use extracorporeal carbon dioxide removal to achieve acceptable blood-gas exchange, thus preventing the need for high minute ventilation and its potential impact on VILI occurrence. Extracorporeal carbon dioxide removal is associated with serious adverse effects and is not currently an option for extremely low birth-weight neonates (Liu et al., 2016). Kohlhauer et al. recently demonstrated that using low intrapulmonary PFOB volumes, measured as the amount of breathable liquid in the lung at the end expiratory pause (EELV), during a short 30-minute course of TLV was associated with less pulmonary inflammation (Kohlhauer et al., 2019). The main objective of the present study was to compare lung inflammation induced by low vs. high tidal-volume TLV in a healthy term lamb model without extracorporeal carbon dioxide removal, while maintaining sustainable gas exchanges for a prolonged period. We hypothesize that, like conventional mechanical gas ventilation, high tidal volume ($H-V_T$) will result in greater lung inflammation and impede complete post-TLV weaning compared to low tidal volume ($L-V_T$).

MATERIAL AND METHODS

Lamb Instrumentation

A total of 21 full-term healthy newborn male lambs aged 3.3 ± 1.2 days were brought to the research facility from a local breeder. The study was approved by the animal research ethics board of the Université de Sherbrooke (protocol #417-17) and performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Sixteen lambs subjected to TLV were premedicated with intramuscular ketamine (10 mg/kg) prior to percutaneous cannulation of the left jugular vein. They were then intubated with a 4.5 mm cuffed endotracheal tube and placed in the supine position. Gas ventilation was initiated (Servo-i, Maquet Critical Care, Solna, Sweden) in the pressure-controlled mode with a respiratory rate of 40 cycles/min and a positive end-expiratory pressure of 5 cmH₂O. The inspiratory pressure was manually adjusted to deliver a tidal volume of approximately 7 mL/kg. Hemoglobin oxygen saturation was continuously recorded by pulse oximetry (Radical, Masimo, Irvine, CA) with a probe at the base of the tail. Lambs were maintained under general anesthesia throughout the TLV phase of the experiment using an intravenous infusion of propofol 120 µg/kg/min and ketamine 1 mg/kg/h, together with a 10% dextrose solution at a rate of 5 mL/kg/h. A catheter was inserted into the left carotid artery under sterile conditions to allow for continuous monitoring of systemic arterial pressure and blood-gas measurements. Lambs were then randomized to either the L-V_T (high respiratory rate) or H-V_T (low respiratory rate) TLV group.

Experimental Protocol

Total Liquid Ventilation

After surgical instrumentation under gas ventilation, the lambs were paralyzed (rocuronium bromide 0.2 mg/kg IV) and disconnected from the gas ventilator for 5 seconds to allow for lung deflation prior to TLV initiation. The lungs were then filled with 20 mL/kg of pre-oxygenated perfluorooctyl bromide (Exflur, Round Rock, TX) at 39°C over 18 seconds, using the INOLIVENT-6 liquid ventilator prototype as previously described (Sage

et al., 2018a). Volume-controlled, pressure-limited, and time-cycled TLV was then initiated with a respiratory rate of 10 cycles/min and a tidal volume of 10 mL/kg (L- V_T group) or a respiratory rate of 5 cycles/min and a tidal volume of 20 mL/kg (H- V_T group). The inspiratory to expiratory time ratio was set at 1:2. The end-expiratory lung volume was progressively increased to 30 mL/kg over the first 10 respiratory cycles to reach a lung volume similar to functional residual capacity (25-30 mL/kg) during conventional mechanical ventilation in this model (Overfield et al., 2001; Wolfson and Shaffer, 2004). Given the complexity of changing respiratory rate with our current liquid ventilator algorithms, respiratory rate was kept constant throughout TLV and tidal volumes were adjusted to maintain targeted blood gases using a permissive hypercapnia approach ($\text{pH} \geq 7.20$ and PaCO_2 from 50 to 65 mmHg (Ryu et al., 2012)). Oxygen concentration in the PFC was adjusted in order to maintain pulse oximetry values above 90%. After 4 hours of total liquid ventilation, the lambs were placed in the prone position. Neostigmine (0.05 mg/kg) and glycopyrrolate (0.01 mg/kg) were administered to reverse rocuronium effect, and the anesthetic infusion was stopped, allowing the lambs to recover from anesthesia. TLV was halted after an expiration, lambs were disconnected from the liquid ventilator and placed in decline position to favor liquid draining into a bottle by gravity. When no more PFOB was coming out of the endotracheal tube (≈ 10 sec), the gas ventilator was connected.

Weaning from Tidal Liquid Ventilation

Figure 1 shows the standardized weaning protocol used. After TLV, the animals were weaned to conventional gas ventilation in the pressure-controlled mode. The initial FiO_2 and ventilatory parameters (peak inspiratory pressure of 15 cmH₂O, PEEP of 6 cmH₂O, respiratory rate of 40/min) were adjusted throughout the weaning protocol to maintain tidal volume at 6–8 mL/kg, $\text{SaO}_2 > 90\%$, and PaO_2 between 60 and 80 mmHg, PaCO_2 between 50 and 65 mmHg, and $\text{pH} > 7.20$. A nasal catheter was inserted into the esophagus to record the electrical activity of the diaphragm (Edi) (Maquet Critical Care, Solna, Sweden) and a nasal mask custom-made for lambs was installed. The lambs were then extubated as soon as they had spontaneous, regular breathing movements with peak inspiratory pressure less than or equal to 12 cmH₂O to generate adequate tidal volumes and placed under nasal neurally-adjusted ventilatory assist (NAVA). The PEEP, FiO_2 and NAVA levels were adjusted to

maintain SaO_2 above 90% and to minimize the clinically assessed work of breathing. The NAVA level was thereafter decreased until the lambs could be switched to nasal CPAP at 5 cmH_2O for at least 15 minutes. The mask was then removed, and supplemental oxygen was delivered via nasal cannulae to maintain $\text{SaO}_2 > 90\%$ and PaO_2 between 60 and 80 mmHg. If PaCO_2 was above 65 mmHg at any point, the nasal CPAP at 5 cmH_2O was reinstalled. If needed, nasal pressure support ventilation and even endotracheal pressure-controlled ventilation could have been instituted again based on the same criteria. The lambs were euthanized 4 hours post-TLV with an IV injection of 90 mg/kg pentobarbital.

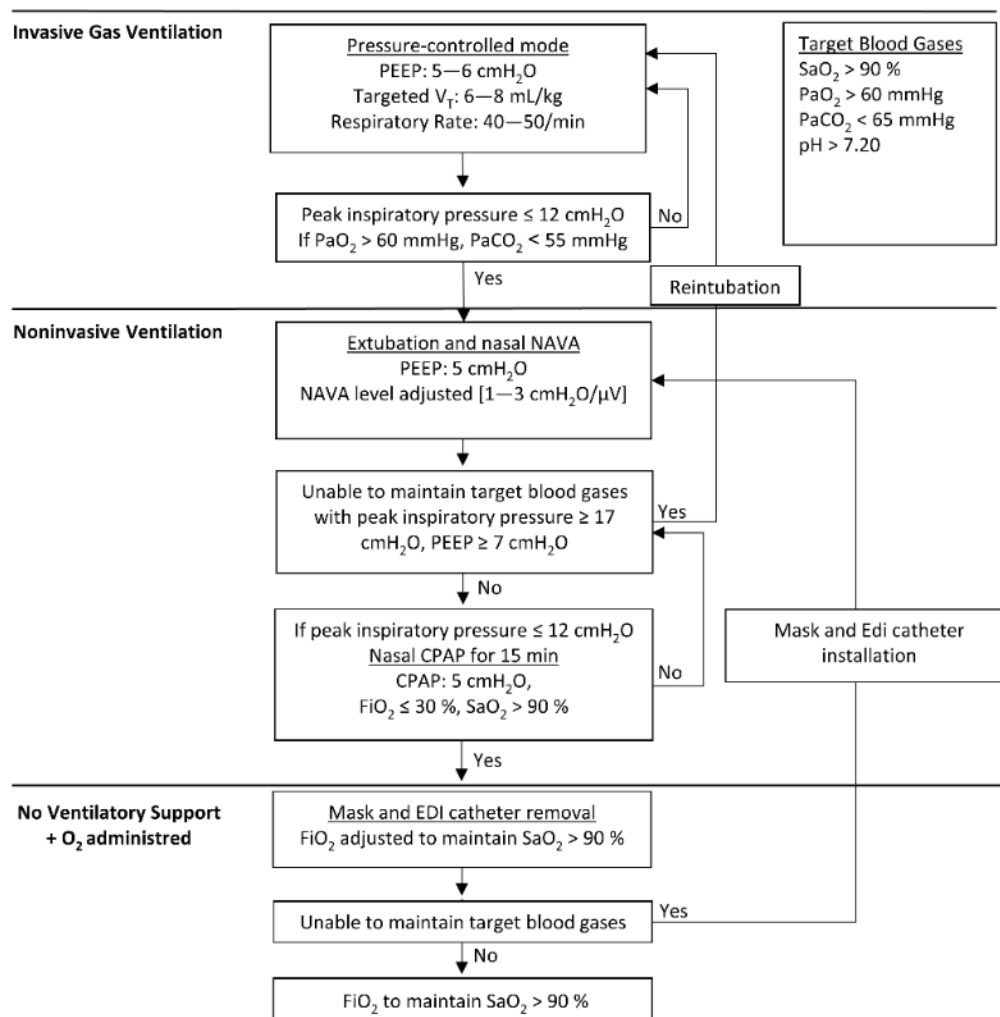


Figure 1: Standardized weaning protocol after total liquid ventilation. CPAP: continuous positive airway pressure and NAVA: neurally adjusted ventilatory assist. SaO_2 : hemoglobin saturation in oxygen (pulse oximetry), PaO_2 : partial pressure of oxygen in

arterial blood. PaCO₂: partial pressure of carbon dioxide in arterial blood, PEEP: positive end-expiratory pressure, V_T: tidal volume.

Control Group

Five lambs were used for histological and RNA transcript analysis without undergoing mechanical ventilation or any other experimental procedure. They were euthanized after peripheral venous cannulation and lung samples were collected.

Histological Score for Lung Inflammation

Samples (2 × 2 × 0.5 cm) from the same region of the peripheral anterior lower lobe and posterior lower lobe of the right lung were collected, fixed, and conserved in 10% formaldehyde. The tissues were then embedded in paraffin, from which 5 µm sections were prepared for hematoxylin/eosin staining. A blinded pathologist examined the slides for the experimental and control groups (SM) using a histological score of lung inflammation previously developed for the newborn lamb (Hillman et al., 2010). Four key components (septation thickness, hemorrhage, inflammatory-cell infiltration, and epithelial sloughing) were assessed, each on a scale of 0 to 2 (total inflammation score of 8).

Gene Transcription Analysis

Samples were collected in the left lung from the same regions as for the histological samples from the right lung and assayed for *IL1B*, *IL6*, and *TNF* gene transcription levels. As the focus of our laboratory will be the use of TLV to prevent bronchopulmonary dysplasia in the years to come, we have oriented the present exploratory analyses as such. We measured the transcription level of 12 other genes selected based on their implication in VILI and bronchopulmonary dysplasia development: *AGER*, *CCL4*, *CSF2*, *CXCL1*, *CXCL8*, *ICAM1*, *IL1A*, *IL1R1*, *IL33*, *NFKB1*, *NFKB2*, and *TNRRSF1A* (Moldoveanu et al., 2008; Huusko et al., 2014). To this end, total RNA extraction was performed on tissue samples preserved in TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at -80°C using TissueLyser (Qiagen, Toronto, ON, Canada). Chloroform was added following the manufacturer's protocol. The aqueous layer was recovered, then mixed with one volume of 70% ethanol and applied directly to a RNeasy

Mini Kit column (Qiagen). DNase treatment and total RNA recovery were performed as per the manufacturer's protocol. RNA quality and presence of contaminating genomic DNA were verified as previously described (Brosseau et al., 2010). RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Reverse transcription was performed on 1.1 µg total RNA with Transcriptor reverse transcriptase, random hexamer primers, deoxynucleoside triphosphate kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), and 10 units of RNaseOUT (*Invitrogen*) according to the manufacturer's protocol in a total volume of 10 µL. Individual forward and reverse primers were resuspended at 20 to 100 µM stock solution in Tris-EDTA buffer (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA). They were thereafter diluted as a primer pair to 1 µM in RNase DNase-free water (Integrated DNA Technologies, Inc.). Quantitative PCR (qPCR) was performed in 384 well plates in a CFX-384 thermocycler (BioRad, Hercules, CA, USA) with 5 µL of 2X iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad), 10 ng (3 µL) cDNA, and 200 nM (2 µL) final primer pair solutions. The following cycling conditions were used: 3 minutes at 95°C, followed by 50 cycles (15 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C). Relative expression levels were calculated with the qBASE framework (Hellemans et al., 2007) and the housekeeping genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Beta-2-microglobulin (B2M), ribosomal protein L13a (RPL13A), and TATA-binding protein (TBP) for lamb cDNA. Primer design and validation were evaluated as previously described (Brosseau et al., 2010). In every qPCR run, a no-template control was performed for each primer pair and the results were consistently negative. All primer sequences are available in supplemental Table 1.

Data Analysis

All RNA levels were normalized to a group of housekeeping-gene expression. RNA transcription results were presented in log₂ (fold change between L-V_T and H-V_T lambs). Principal component analysis and hierarchical clustering were performed, as exploratory analyses, with R software⁷. *Statistical analyses were performed with* SPSS 19 (IBM, Armonk, NY). Gene expression data in each group were reported as mean ± SD (unless specified otherwise), and the groups compared with a 2-sided non-paired t-test. Histological-

⁷ <https://www.r-project.org>

score results were reported as median (Q1; Q3) and compared with the Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney U test. A value of $p < 0.05$ was deemed to be statistically significant.

RESULTS

The lambs from all groups were similar in age and weight (**Table 1**). All were successfully weaned to spontaneous breathing at 4 hours post-TLV, except for one lamb in the H-V_T group that remained intubated because of anesthesia-related weak respiratory efforts; the lamb's extubation time was not considered in the analysis.

Table 1: Lamb characteristics at baseline and blood gases. ID : Identification, GV: gas ventilation, TLV: total liquid ventilation (L-V_T: low tidal volume, H-V_T: high tidal volume); CTL: control lambs without ventilation; PaO₂: partial pressure of oxygen in arterial blood; SaO₂: hemoglobin saturation in oxygen (pulse oximetry); PaCO₂: partial pressure of carbon dioxide in arterial blood; HCO₃⁻: arterial concentration of bicarbonate ions. $p < 0.05$ in comparison with a: baseline, b: 2 h time point, c: 4 h time point.

Parameters	ID	GV	TLV		Weaning	
		Baseline	2h	4h	6h	8h
Age (Days of life)	L-V _T	4.0 ± 1.2	-	-	-	-
	H-V _T	3.0 ± 1.4	-	-	-	-
	CTL	2.8 ± 0.8	-	-	-	-
	<i>p</i> value	0.2	-	-	-	-
Weight (kg)	L-V _T	3.8 ± 0.8	-	-	-	-
	H-V _T	3.4 ± 0.6	-	-	-	-
	CTL	3.6 ± 0.4	-	-	-	-
	<i>p</i> value	0.2	-	-	-	-
PaO ₂ (mmHg)	L-V _T	95 ± 13	108 ± 30	97 ± 32	86 ± 26 ^b	75 ± 8 ^{a,b}
	H-V _T	82 ± 16	116 ± 34	104 ± 53	85 ± 19	90 ± 35
	<i>p</i> value	0.3	0.6	0.7	1.0	0.3
SaO ₂ (%)	L-V _T	97 ± 3	96 ± 3	95 ± 7	96 ± 4	96 ± 3
	H-V _T	97 ± 3	99 ± 1	99 ± 2	96 ± 2	98 ± 2
	<i>p</i> value	0.3	0.6	0.9	0.4	0.4
PaCO ₂ (mmHg)	L-V _T	41 ± 5	62 ± 15 ^a	60 ± 21 ^a	41 ± 6 ^{b,c}	39 ± 7 ^{b,c}
	H-V _T	38 ± 7	63 ± 12 ^a	58 ± 17 ^a	41 ± 7 ^{b,c}	42 ± 5 ^{b,c}
	<i>p</i> value	0.3	0.9	0.7	1.0	0.4
pH	L-V _T	7.35 ± 0.07	7.21 ± 0.10 ^a	7.26 ± 0.14	7.40 ± 0.07 ^{a,c}	7.42 ± 0.06 ^{a,b,c}
	H-V _T	7.39 ± 0.10	7.22 ± 0.06 ^a	7.23 ± 0.08	7.38 ± 0.07 ^{b,c}	7.40 ± 0.05 ^{b,c}
	<i>p</i> value	0.3	0.9	0.9	0.5	0.4
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	L-V _T	21.3 ± 2.1	20.6 ± 3.0	21.4 ± 2.0	24.4 ± 3.2 ^{a,c}	25.1 ± 3.6
	H-V _T	21.9 ± 3.1	20.7 ± 1.3	20.3 ± 0.9	23.0 ± 2.3 ^c	24.1 ± 1.8 ^{b,c}
	<i>p</i> value	0.7	0.9	0.2	0.3	0.5

Table 2 provides the ventilatory parameters. They were identical in the H- V_T and L- V_T groups at all time points, except for tidal volume and respiratory rate. Tidal volume nevertheless needed to be raised in the L- V_T group from 10 mL/kg (at TLV initiation) to 14 ± 2 mL/kg within the first 2 hours of TLV to achieve the targeted PaCO_2/pH values; the tidal volume remained stable thereafter. Minute ventilation in the L- V_T group was thus significantly higher than in the H- V_T group in order to achieve similar PaCO_2 and pH values, as expected. The end-expiratory lung volume of PFC was closely monitored and kept minimal in both groups, while avoiding end-expiratory tracheal collapse (35 ± 11 mL/kg).

Lambs in the L- V_T group were extubated after 72 ± 26 minutes, while those in the H- V_T group were extubated after 63 ± 25 minutes ($p = 0.5$). At 2 hours post-TLV, four lambs in the L- V_T group and five lambs in the H- V_T group were under nasal NAVA. At 4 hours post-TLV, one lamb in the L- V_T and two lambs in the H- V_T group remained under NAVA. The majority (seven in the L- V_T , five in the H- V_T group) of the lambs were only on supplemental oxygen. FiO_2 requirements at the end of the experiment were similar in the L- V_T and H- V_T groups at $27 \pm 6\%$ and $33 \pm 7\%$, respectively; $p = 0.3$). Blood gases were similar in both groups at all time points (**Table 1**).

Table 2: Ventilatory parameters

FiO₂: fraction of inspired oxygen; FgO₂: fraction of oxygen bubbled in PFOB in the ventilator; V_E: minute ventilation; PIP: peak inspiratory pressure; EIPP: end-inspiratory pause pressure; EELV: end-expiratory liquid volume; PEEP: positive end-expiratory pressure; EEPP: end-expiratory pause pressure (TLV). See legend of Table 1 for other abbreviations.

Parameters	ID	GV	TLV		Weaning	
		Baseline	2h	4h	6h	8h
FiO ₂ - FgO ₂ (%)	L-V _T	27 ± 6	94 ± 12	93 ± 12	31 ± 7	27 ± 6
	H-V _T	24 ± 5	96 ± 6	96 ± 8	37 ± 10	33 ± 7
	<i>p</i> value	0.2	0.6	0.6	0.2	0.3
V _T (ml/kg)	L-V _T	7.4 ± 0.8	14 ± 2	14 ± 4	-	-
	H-V _T	7.7 ± 0.8	18 ± 1	20 ± 1 ^b	-	-
	<i>p</i> value	0.5	< 0.001	< 0.001		
Respiratory rate (/min)	L-V _T	41 ± 8	10 ± 0	10 ± 0	58 ± 12	62 ± 6
	H-V _T	44 ± 7	5 ± 0	5 ± 0	69 ± 22	60 ± 12
	<i>p</i> value	0.4	< 0.001	< 0.001	0.2	0.7
V _E (mL/kg/min)	L-V _T	303 ± 75	137 ± 22	149 ± 43	-	-
	H-V _T	341 ± 63	90 ± 7	100 ± 5 ^b	-	-
	<i>p</i> value	0.3	< 0.001	< 0.001		
PIP- EIPP (cmH ₂ O)	L-V _T	13 ± 2	8 ± 6	9 ± 7 ^b	-	-
	H-V _T	15 ± 4	9 ± 3	9 ± 3	-	-
	<i>p</i> value	0.3	0.5	0.8		
PEEP - EEPP (cmH ₂ O)	L-V _T	6 ± 1	0 ± 4	0 ± 4	-	-
	H-V _T	5 ± 0	-1 ± 3	-2 ± 4	-	-
	<i>p</i> value	0.1	0.5	0.3		
EELV (mL/kg)	L-V _T	-	32 ± 5	35 ± 13	-	-
	H-V _T	-	33 ± 7	35 ± 9	-	-
	<i>p</i> value	-	0.6	0.9		

Histological inflammation score

Both TLV groups had significantly higher inflammation scores compared to the control non-ventilated group, mainly due to increased septation thickness (**Figure 2**). The histological score also tended to indicate higher inflammation in the L-V_T group compared to the H-V_T group in the anterior lung region, although this difference did not reach statistical significance (**Figure 2**).

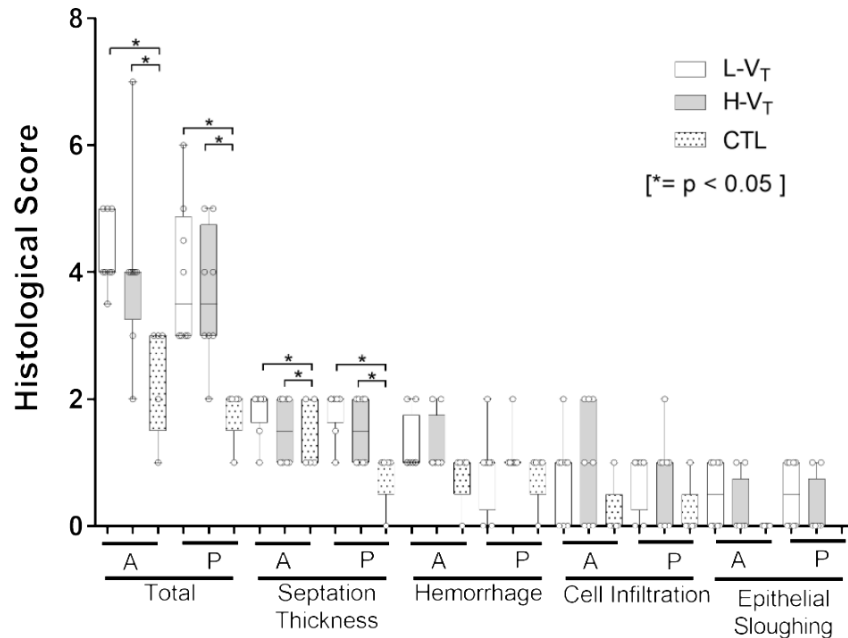


Figure 2: Inflammation histological score in lambs subjected to TLV with L-V_T (n = 8), H-V_T (n = 8), and CTL (n = 5). The total score out of eight represents the sum of the four categories scored over two (septation thickness, hemorrhage, cell infiltration, and epithelial sloughing). A: anterior region of the lung; P: posterior lung region. A higher score indicates more inflammation. Each point represents a lamb and each line represents the median and the first and third quartiles (Q1; Q3). *: statistically significant difference ($p < 0.05$).

Inflammatory-gene expression

Lung tissue *IL1B* mRNA was significantly more expressed in the L-V_T group than the H-V_T group in both the anterior and posterior lung regions (**Figures 3 A and B**). The expression of both *IL6* and *TNF* transcripts was greater in the L-V_T group, but the difference was not significant (**Figures 3 A and B**). When compared to the control lambs, the L-V_T lambs exhibited a significantly higher expression of *IL1B* ($p = 0.01$), *IL6* ($p = 0.006$), and *TNF* ($p = 0.04$) in the anterior region, while *IL1B* and *IL6* were significantly upregulated in the posterior region ($p < 0.001$; $p = 0.03$, respectively) (**Figures 3 C and D**). On the other hand, only *TNF* was upregulated in the posterior region ($p = 0.002$) in the H-V_T group compared to the control lambs (**Figures 3 D**).

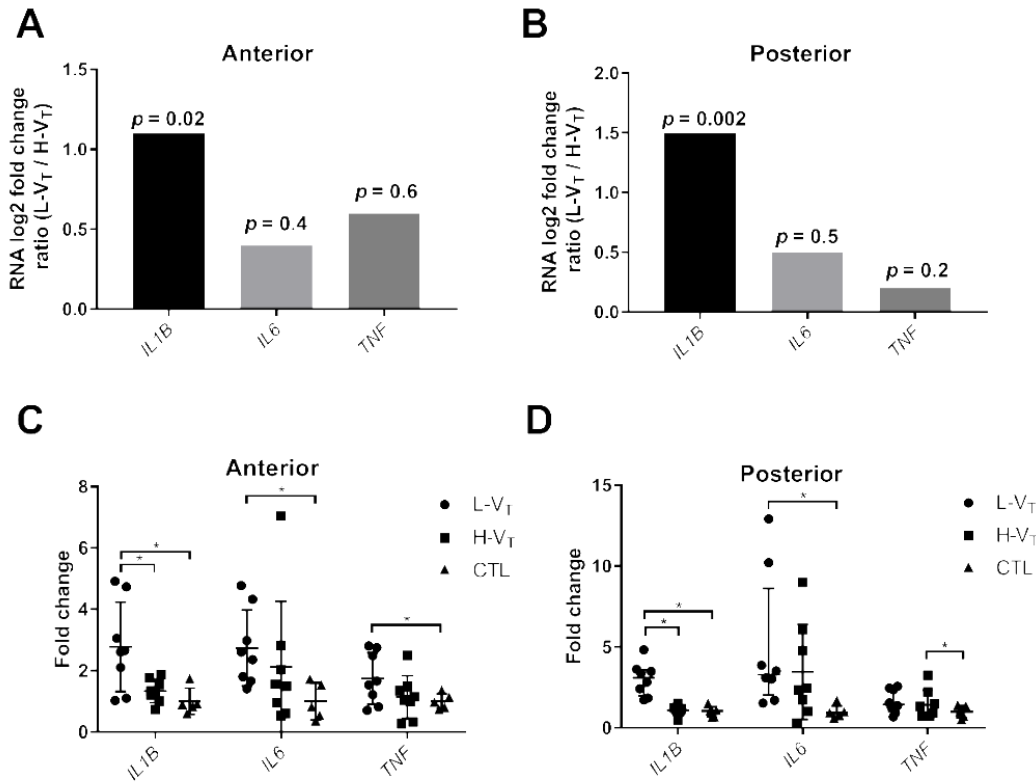


Figure 3: Expression of the *IL1B*, *IL6* and *TNF* genes illustrated by log2 fold changes in L-V_T relative to H-V_T lambs in the anterior (A) and posterior (B) lung regions, and fold changes in gene expression of L-V_T, H-V_T and unventilated lambs relative to housekeeping genes using qBase relative quantification framework method [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta-2-microglobulin (B2M), ribosomal protein L13a (RPL13A), and TATA-binding protein (TBP)] in the anterior (C) and posterior (D) lung regions. Each dot represents a lamb, with mean \pm standard deviation. * = $p < 0.05$.

A principal component analysis showed clear separation between unventilated, H-V_T and L-V_T ventilated lamb groups, with consistent gene expression profiles between the anterior and posterior lung regions (**Figure 4A**). Unsupervised clustering of individual gene expression revealed four main findings: 1) pronounced inflammatory transcriptional changes in both groups of liquid ventilated lungs compared to unventilated lamb, 2) three main gene expression clusters, with an increased pro-inflammatory gene expression profile in L-V_T lungs, but not in the H-V_T or unventilated lambs; 3) a distinct transcriptional response in lung tissues from L-V_T compared to H-V_T ventilated lambs and 4) greater ventilation-

DISCUSSION

Given TLV's potential to reduce VILI in neonate chronic lung disease, our study provides important information about how to optimize its potential using different levels of tidal volume. The main finding of our study is that TLV with low tidal volume was associated with more inflammatory-gene expression than TLV using high tidal volume. In addition, our results show the possibility to consistently achieve weaning from TLV to spontaneous breathing within two hours post-TLV.

The overall transcription profile suggests that a TLV strategy using an H-V_T may induce less lung inflammation than L-V_T. Interestingly, observations were consistent between the anterior and posterior regions of the lungs implying that our results are not simply due to a sampling bias. In addition to *IL1B*, genes encoding for important proteins of the inflammatory cascade, such as *CXCL8*, *TNF*, *CSF2* and *NFKB1*, were also more expressed in the L-V_T group. Nevertheless, *IL33* was upregulated in the H-V_T group compared to the L-V_T group. This cytokine can be pro-inflammatory or anti-inflammatory depending on its environment (Zhao and Zhao, 2015). In this case, it remains unclear whether the level of *IL33* transcription induced less or more lung inflammation in the H-V_T group. Overall, although heterogenous, the gene-expression profile we found in the L-V_T lambs was more consistent with VILI literature data than the profile observed in the H-V_T lambs. Moreover, the gene expression profile in H-V_T lambs suggests that higher tidal volume may be more lung protective compared to L-V_T in TLV. It is interesting to note opposing inflammatory cytokine gene expression profiles between the L-V_T and H-V_T experimental groups. Indeed, instead of having only up regulation in one group and no change in the other, we had genes that were overexpressed in one group while the same genes were down regulated in the other groups. This effect was reproducible in two different regions and therefore is unlikely to represent a measure artifact. This intriguing finding suggests that different tidal volumes trigger qualitatively distinct inflammatory responses in the lungs. These findings definitely require a closer look in a future study, in order to understand the mechanisms involved in these qualitative differences and their clinical implication in terms of choosing the right lung protective ventilatory strategy.

Our results contradict our hypothesis favoring the use of L- V_T to prevent lung inflammation. Importantly, L- V_T lambs required 50% higher minute ventilation—i.e., a higher respiratory rate—than H- V_T lambs in order to maintain PaCO_2 and pH values within the targeted limits. This was likely due to the known low gas diffusion velocity in perfluorochemicals compared to a gaseous medium (Costantino and Fiore, 2001). This effect could be exacerbated in the ovine model, known for its larger anatomic dead space (Albertine, 2013). It should be noted that our strategy aimed at strictly maintaining the end-expiratory liquid volume at the lowest possible level might have mitigated lung overdistension/volutrauma, a crucial VILI mechanism during TLV, as shown by Kohlhauer et al. (Kohlhauer et al., 2019). The benefits of limiting the end-inspiratory lung volume might, however, be offset by the disadvantages of the higher respiratory rate required in L- V_T lambs. Indeed, a lower respiratory rate has been associated with less alveolar shear stress and lung inflammation during conventional gas ventilation (Hotchkiss et al., 2000; Rich et al., 2000; Vaporidi et al., 2008; Chen et al., 2015).

Very few authors have demonstrated the possibility of achieving complete weaning a neonatal animal after TLV (Jackson et al., 1994; Stavis et al., 1998). Jackson et al. were able to wean two near-term healthy non-human primates after 5 hours of conventional mechanical ventilation following 3 hours of TLV, while Stavis et al. reported weaning three full-term lambs from 4 hours of TLV to spontaneous breathing after 16 hours. The present study confirms that it is possible to consistently wean healthy full-term lambs from 4 hours of TLV to spontaneous breathing within 2 hours.

Although the L- V_T lambs exhibited a more inflammatory profile, no clinically relevant difference was observed during the weaning process, including oxygen requirement, respiratory rate, and arterial-blood gases. Most animals presented mild respiratory distress during the first 30 to 90 minutes following extubation. Most required oxygen, and some required continuous positive airway pressure for 4 hours after TLV. PaCO_2 levels and respiratory rate were, however, normal at that point. As anticipated, residual liquid PFC likely affects respiratory mechanics and gas exchange during the first few hours following TLV, while it is being cleared from the lung through evaporation and coughing (Bendel-

Stenzel et al., 1998). This is consistent with a past study showing that recovery from TLV in near-term non-human primates was associated with the need for supplemental oxygen in the first 24 to 72 hours post-TLV (Jackson et al., 1994). A study is currently underway in our lab to assess respiratory mechanics during weaning after TLV.

Limitations of the study

One limitation of our study is its small sample size, which limits power and thus, our ability to demonstrate further differences between the groups. In addition, we decided to proceed to weaning from TLV in order to identify clinically relevant differences post-TLV between the two groups as well as to assess the feasibility of such weaning. The transition from TLV back to gas ventilation might come at the cost of inducing inflammation. Since lambs from both groups were, however, consistently weaned according to the same standardized protocol, we do not believe this introduced a bias in our study. The only animal that could not be extubated because of profound sedation was in the H-V_T group; this would have affected the results in favor of the L-V_T group, contrarily to our results.

As with all animal models, anatomic and gene expression differences with the human newborn are possible. Clinical trials will be needed before this technology can be used as a standard treatment in the neonatal intensive care units. Gene expression levels were assessed in this study. The authors acknowledge that protein levels as well as functional respiratory assessment after a longer course of TLV would be beneficial in confirming our findings. Nevertheless, this study represents a first step and brings new knowledge in delineating the optimal TLV strategy in newborns.

CONCLUSION

Our results suggest that a TLV strategy using high tidal volume and low respiratory rate is associated with reduced lung inflammation compared to low tidal volume and high respiratory rate. TLV modality did not, however, affect weaning to spontaneous breathing, which was achieved within a 4-hour time window. The ability to consistently wean neonatal lambs is a major milestone in TLV research and paves the way for an eventual clinical trial.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the RNA transcript platform of the Université de Sherbrooke for the design of the primers and the quantification of ARN transcript. The experiments were performed at the Université de Sherbrooke animal facility.

List of Abbreviations

CPAP	Continuous positive airway pressure
CTL	Control lambs without ventilation
EELV	End-expiratory liquid volume
EEPP	End-expiratory pause pressure
EIPP	End-inspiratory pause pressure
FgO ₂	Fraction of oxygen bubbled in PFOB
FiO ₂	Fraction of inspired oxygen
HCO ₃ ⁻	Arterial concentration of bicarbonate ions
H-V _T	Total liquid ventilation with high tidal volume
<i>IL1B</i>	Interleukin-1 gene
<i>IL6</i>	Interleukin-6 gene
<i>IL8</i>	Interleukin-8 gene
L-V _T	Total liquid ventilation with low tidal volume
NAVA	Neurally adjusted ventilatory assist
PaCO ₂	Partial pressure of carbon dioxide in arterial blood
PaO ₂	Partial pressure of oxygen in arterial blood
PEEP	Positive end-expiratory pressure
PFC	Perfluorochemical
PFOB	Perfluorooctyl bromide
PIP	Peak inspiratory pressure
SaO ₂	Hemoglobin saturation in oxygen (pulse oximetry)
TLV	Total liquid ventilation
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor- α gene
V _E	Minute ventilation

VILI	Ventilator-induced lung injury
V_T	Tidal volume

Author Contributions

Original idea and design of the study: EFP, PM, JPP, BC, MS; experiments: MS, WS, SN, EFP; data collection, analysis, and interpretation: MS, WS, SN, CMichalski, EFP, BC, SM, PL, JPP; manuscript: MS, WS, CMichalski, SN, CMorin, SM, PL, BC, JPP, EFP.

Conflict-of-Interest Statement

Philippe Micheau and Jean-Paul Praud are co-inventors of patents related to the ventilator prototype used in this study (Apparatus for conducting total liquid ventilation with control of residual volume and ventilation cycle profile, US 7,726,311 B2, EP 1 424 090 B1, CA 2,451,261 and Indirect measurement in a total liquid ventilation system, PCT/CA2014/205548 US 2016/0271348 A1).

REFERENCES

- Albertine, K.H. (2013). Progress in understanding the pathogenesis of BPD using the baboon and sheep models. *Seminars in perinatology* 37(2), 60-68. doi: 10.1053/j.semperi.2013.01.001.
- Avoine, O., Bosse, D., Beaudry, B., Beaulieu, A., Albadine, R., Praud, J.P., et al. (2011). Total liquid ventilation efficacy in an ovine model of severe meconium aspiration syndrome. *Crit Care Med* 39(5), 1097-1103. doi: 10.1097/CCM.0b013e31820ead1a.
- Bagnoli, P., Tredici, S., Seetharamaiah, R., Brant, D.O., Hewell, L.A., Johnson, K., et al. (2007). Effect of repeated induced airway collapse during total liquid ventilation. *Asaio j* 53(5), 549-555. doi: 10.1097/MAT.0b013e318148449d.
- Bendel-Stenzel, E.M., Mrozek, J.D., Bing, D.R., Meyers, P.A., Connett, J.E., and Mammel, M.C. (1998). Dynamics of spontaneous breathing during patient-triggered partial liquid ventilation. *Pediatr Pulmonol* 26(5), 319-325. doi: 10.1002/(sici)1099-0496(199811)26:5<319::aid-ppul3>3.0.co;2-v.
- Brosseau, J.P., Lucier, J.F., Lapointe, E., Durand, M., Gendron, D., Gervais-Bird, J., et al. (2010). High-throughput quantification of splicing isoforms. *Rna* 16(2), 442-449. doi: 10.1261/rna.1877010.
- Chen, Z.L., Song, Y.L., Hu, Z.Y., Zhang, S., and Chen, Y.Z. (2015). An estimation of mechanical stress on alveolar walls during repetitive alveolar reopening and closure. *J Appl Physiol (1985)* 119(3), 190-201. doi: 10.1152/japplphysiol.00112.2015.
- Ciuffini, F., Robertson, C.F., and Tingay, D.G. (2018). How best to capture the respiratory consequences of prematurity? *Eur Respir Rev* 27(147). doi: 10.1183/16000617.0108-2017.

- Costantino, M.L., Bagnoli, P., Dini, G., Fiore, G.B., Soncini, M., Corno, C., et al. (2004). A numerical and experimental study of compliance and collapsibility of preterm lamb tracheae. *J Biomech* 37(12), 1837-1847. doi: 10.1016/j.jbiomech.2004.02.035.
- Costantino, M.L., and Fiore, G.B. (2001). A model of neonatal tidal liquid ventilation mechanics. *Med Eng Phys* 23(7), 457-471.
- Davidson, L.M., and Berkelhamer, S.K. (2017). Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes. *Journal of clinical medicine* 6(1), 4. doi: 10.3390/jcm6010004.
- Farrell, O., Perkins, E.J., Black, D., Miedema, M., Paul, J.D., Pereira-Fantini, P.M., et al. (2018). Volume guaranteed? Accuracy of a volume-targeted ventilation mode in infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 103(2), F120-f125. doi: 10.1136/archdischild-2017-312640.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8(2), R19. doi: 10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- Hillman, N.H., Kallapur, S.G., Pillow, J.J., Moss, T.J., Polglase, G.R., Nitsos, I., et al. (2010). Airway injury from initiating ventilation in preterm sheep. *Pediatr Res* 67(1), 60-65. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181c1b09e.
- Hotchkiss, J.R., Jr., Blanch, L., Murias, G., Adams, A.B., Olson, D.A., Wangensteen, O.D., et al. (2000). Effects of decreased respiratory frequency on ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 161(2 Pt 1), 463-468. doi: 10.1164/ajrccm.161.2.9811008.

- Huusko, J.M., Karjalainen, M.K., Mahlman, M., Haataja, R., Kari, M.A., Andersson, S., et al. (2014). A study of genes encoding cytokines (IL6, IL10, TNF), cytokine receptors (IL6R, IL6ST), and glucocorticoid receptor (NR3C1) and susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. *BMC medical genetics* 15, 120-120. doi: 10.1186/s12881-014-0120-7.
- Jackson, J.C., Standaert, T.A., Truog, W.E., and Hodson, W.A. (1994). Full-tidal liquid ventilation with perfluorocarbon for prevention of lung injury in newborn non-human primates. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22(4), 1121-1132.
- Jiang, L., Feng, H., Chen, X., Liang, K., and Ni, C. (2016). Low Tidal Volume Reduces Lung Inflammation Induced by Liquid Ventilation in Piglets With Severe Lung Injury. *Artif Organs*. doi: 10.1111/aor.12784.
- Koen, P.A., Wolfson, M.R., and Shaffer, T.H. (1988). Fluorocarbon ventilation: maximal expiratory flows and CO₂ elimination. *Pediatr Res* 24(3), 291-296. doi: 10.1203/00006450-198809000-00003.
- Kohlhauer, M., Boissady, E., Lidouren, F., de Rochefort, L., Nadeau, M., Rambaud, J., et al. (2019). A new paradigm for lung-conservative total liquid ventilation. *EBioMedicine*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.026>.
- Liu, Z., Duarte, R.V., Bayliss, S., Bramley, G., and Cummins, C. (2016). Adverse effects of extracorporeal carbon dioxide removal (ECCO₂R) for acute respiratory failure: a systematic review protocol. *Systematic reviews* 5, 98-98. doi: 10.1186/s13643-016-0270-0.
- Moldoveanu, B., Otmishi, P., Jani, P., Walker, J., Sarmiento, X., Guardiola, J., et al. (2008). Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of inflammation research* 2, 1-11.

- Nadeau, M., Denaclara, J.-Y., Tissier, R., Walti, H., and Micheau, P. (2018). Patient-specific optimal cooling power command for hypothermia induction by liquid ventilation. *Control Engineering Practice* 77, 109-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.conengprac.2018.05.007>.
- Overfield, D.M., Bennett, S.H., Goetzman, B.W., Milstein, J.M., and Moon-Grady, A.J. (2001). Hemodynamic effects of positive end-expiratory pressure during partial liquid ventilation in newborn lambs. *J Pediatr Surg* 36(9), 1327-1332. doi: 10.1053/jpsu.2001.26360.
- Pohlmann, J.R., Brant, D.O., Daul, M.A., Reoma, J.L., Kim, A.C., Osterholzer, K.R., et al. (2011). Total Liquid Ventilation Provides Superior Respiratory Support to Conventional Mechanical Ventilation in a Large Animal Model of Severe Respiratory Failure. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)* 57(1), 1-8. doi: 10.1097/MAT.0b013e3182018a9f.
- Rich, P.B., Reickert, C.A., Sawada, S., Awad, S.S., Lynch, W.R., Johnson, K.J., et al. (2000). Effect of rate and inspiratory flow on ventilator-induced lung injury. *J Trauma* 49(5), 903-911.
- Robert, R., Micheau, P., Avoine, O., Beaudry, B., Beaulieu, A., and Walti, H. (2010). A regulator for pressure-controlled total-liquid ventilation. *IEEE Trans Biomed Eng* 57(9), 2267-2276. doi: 10.1109/tbme.2009.2031096.
- Robert, R., Micheau, P., and Walti, H. (2007). A supervisor for volume-controlled tidal liquid ventilator using independent piston pumps. *Biomedical Signal Processing and Control* 2(3), 267-274. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2007.07.010>.
- Robert, R., Micheau, P., and Walti, H. (2009). Optimal expiratory volume profile in tidal liquid ventilation under steady state conditions, based on a symmetrical lung model. *Asaio j* 55(1), 63-72. doi: 10.1097/MAT.0b013e3181911821.

- Ryu, J., Haddad, G., and Carlo, W.A. (2012). Clinical effectiveness and safety of permissive hypercapnia. *Clin Perinatol* 39(3), 603-612. doi: 10.1016/j.clp.2012.06.001.
- Sage, M., Nadeau, M., Forand-Choiniere, C., Mousseau, J., Vandamme, J., Berger, C., et al. (2018a). Assessing the impacts of total liquid ventilation on left ventricular diastolic function in a model of neonatal respiratory distress syndrome. 13(1), e0191885. doi: 10.1371/journal.pone.0191885.
- Sage, M., Stowe, S., Adler, A., Forand-Choiniere, C., Nadeau, M., Berger, C., et al. (2018b). Perflubron Distribution During Transition From Gas to Total Liquid Ventilation. *Front Physiol* 9, 1723. doi: 10.3389/fphys.2018.01723.
- Shaffer, T.H., Wolfson, M.R., and Greenspan, J.S. (1999). Liquid ventilation: current status. *Pediatr Rev* 20(12), e134-142.
- Snoek, K.G., Houmes, R.J., and Tibboel, D. (2014). Liquid ventilation in congenital diaphragmatic hernia: back on stage? *Pediatr Crit Care Med* 15(9), 914-915. doi: 10.1097/pcc.0000000000000284.
- Stavis, R.L., Cox, C.A., Wolfson, M.R., Cullen, A.B., Roache, R., Hipp, S., et al. (1998). Tidal Liquid Ventilation (TLV) Transition to Spontaneous Breathing(SB): 24 Hour Follow-up of Physiologic and Radiographic Correlates 1748. *Pediatr Res* 43(S4), 298-298.
- Thomassen, M.J., Buhrow, L.T., and Wiedemann, H.P. (1997). Perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Crit Care Med* 25(12), 2045-2047.

- Tooley, R., Hirschl, R.B., Parent, A., and Bartlett, R.H. (1996). Total liquid ventilation with perfluorocarbons increases pulmonary end-expiratory volume and compliance in the setting of lung atelectasis. *Crit Care Med* 24(2), 268-273.
- Vaporidi, K., Voloudakis, G., Priniannakis, G., Kondili, E., Koutsopoulos, A., Tsatsanis, C., et al. (2008). Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury at a constant PaCO₂ in a mouse model of normal lung. *Crit Care Med* 36(4), 1277-1283. doi: 10.1097/CCM.0b013e318169f30e.
- Wolfson, M.R., Hirschl, R.B., Jackson, J.C., Gauvin, F., Foley, D.S., Lamm, W.J., et al. (2008). Multicenter comparative study of conventional mechanical gas ventilation to tidal liquid ventilation in oleic acid injured sheep. *Asaio j* 54(3), 256-269. doi: 10.1097/MAT.0b013e318168fef0.
- Wolfson, M.R., and Shaffer, T.H. (2004). Liquid ventilation: an adjunct for respiratory management. *Paediatr Anaesth* 14(1), 15-23.
- Woods, C.M., Neslund, G., Kornbrust, E., and Flaim, S.F. (2000). Perflubron attenuates neutrophil adhesion to activated endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(5), L1008-1017.
- Zhao, J., and Zhao, Y. (2015). Interleukin-33 and its Receptor in Pulmonary Inflammatory Diseases. *Critical reviews in immunology* 35(6), 451-461. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2016015865.

CHAPITRE 6. DISCUSSION

6.1 Choix du modèle ovin néonatal :

Cette section explique le choix du modèle ovin dans la réalisation des travaux présentés dans cette thèse. Puis, elle permet d'expliquer l'utilisation du modèle de déficit induit en surfactant par lavages pulmonaires répétés.

6.1.1 Agneau nouveau-né

Les agneaux sont considérés comme le modèle animal de choix dans les études portant sur le système cardiorespiratoire en période néonatale. Ils ont un poids et une physiologie cardiorespiratoire très similaire à ce que l'on retrouve chez l'humain à la naissance. Contrairement au modèle murin, les ovins ont un développement pulmonaire qui ressemble beaucoup à l'humain, ce qui en fait un modèle de choix pour les études en VLT (Schittny 2017). Bien qu'ils soient des ruminants, les agneaux sont monogastriques et non-ruminants durant les deux premières semaines de vie (Djeddi et al. 2012, Cantin et al. 2016). Cette caractéristique physiologique fait en sorte de ne pas perturber la compliance du système respiratoire due à l'accumulation de gaz dans le rumen et rend possible les études respiratoires (Jonker et al. 2007). Albertine et al. ont montré la possibilité de ventiler de façon chronique des agneaux prématurés durant plusieurs semaines sans difficulté respiratoire particulière (Albertine 2015). Par ailleurs, les modèles de grands animaux comme l'agneau ont aussi l'avantage de permettre l'utilisation d'une instrumentation identique à l'humain. Par exemple, il est possible d'utiliser les mêmes ventilateurs, cathéters et appareils de mesure que ceux utilisés en clinique, ce qui ne serait pas possible chez des modèles plus petits tels que les rongeurs. De plus, la grande disponibilité, la robustesse et la docilité des agneaux constituent des avantages majeurs du modèle ovin puisqu'ils permettent de réaliser de longues heures d'expérimentation en l'absence de sédation afin de mimer des situations plus réalistement physiologiques (Meeusen et al. 2009).

6.1.2 Modèle ovin de déficit induit en surfactant

Afin de réaliser les études qui ont mené à la rédaction de l'article 1 et l'article 2 de cette thèse, un modèle de déficit induit en surfactant a été réalisé. Cette décision a été prise dans l'optique de mimer un phénotype d'extrême prématuré où le déficit en surfactant engendre la MMH (Reuter et al. 2014). Pour ce faire, une technique de lavages répétés des poumons avec du sérum physiologique jusqu'à l'obtention d'une PaO_2/FiO_2 inférieure à 100 mm Hg durant 20 minutes a été utilisée. Cette technique a été décrite, pour la première fois, par Lachmann et al. en 1980 afin d'induire une détresse respiratoire sévère. Durant les 40 dernières années, plusieurs variantes ont été mises en place et testées, notamment l'injection d'acide oléique et de lipopolysaccharides (Lachmann et al. 1980, Wang et al. 2008). L'ajout d'acide oléique permet de briser la barrière alvéolo-capillaire, ce qui résulte en une exsudation de plasma dans les alvéoles contribuant à désactiver le surfactant et induire la détresse respiratoire (Zhu et al. 2013). Les lipopolysaccharides, quant à eux, induisent une puissante réaction inflammatoire médiée par les récepteurs de type Toll-like-4 ce qui engendre une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire. (Eutamene et al. 2005). Le modèle de Lachmann a été choisi car il permet d'obtenir un phénotype proche de ce que l'on retrouve chez des patients avec déficit endogène en surfactant (Martin et Matute-Bello 2011). Ce modèle a permis de reproduire la pathologie chez l'agneau nouveau-né tel que décrit par Vrancken et al. en 2012 (Vrancken et al. 2012), mais également chez d'autres animaux comme le porcelet (Degraeuwe et al. 2000, Odenstedt et al. 2005), le chien (Kloot et al. 2000) et le chat (Rieger-Fackeldey et al. 2005). Le modèle utilisé a d'ailleurs montré une bonne reproductibilité des paramètres respiratoires après l'induction du déficit en surfactant.

6.2 Discussion de l'article 1

L'utilisation de la ventilation mécanique à pression positive est associée à des effets hémodynamiques. En respiration spontanée, la pression intrathoracique est négative ce qui favorise le retour veineux systémique vers la cage thoracique. À l'inverse, lorsqu'un patient est sous ventilation mécanique, la pression intrathoracique devient positive, ce qui diminue la précharge ventriculaire droite notamment en diminuant le retour veineux. De plus, la pression intrathoracique vient jouer sur la résistance vasculaire pulmonaire et le tout contribue à augmenter la postcharge du ventricule droit. Étant donné l'arrangement en série du cœur droit et du cœur gauche après la naissance, la précharge ventriculaire gauche est conséquemment diminuée, de même que le débit cardiaque. Les fluctuations du débit cardiaque peuvent être néfastes chez les extrêmes prématurés, particulièrement au niveau cérébral. En effet, plus un nouveau-né est prématuré, plus les mécanismes cérébraux d'autorégulation de la pression artérielle sont immatures (Rhee et al. 2018). Par conséquent, les résistances vasculaires cérébrales ne peuvent compenser adéquatement pour la diminution du débit cardiaque, ce qui provoque une baisse de pression artérielle cérébral. La diminution de perfusion des tissus cérébraux qui en découle peut nuire au développement neurologique des extrêmes prématurés (Hagberg et al. 2002, Mallard et al. 2003). À l'inverse, la pression positive associée à l'utilisation d'une PEEP peut aider la contraction du myocarde en diminuant la postcharge ventriculaire gauche. En effet, en l'absence de support ventilatoire à pression positive, le myocarde doit combattre la pression intrathoracique négative lorsqu'il se contracte. C'est d'ailleurs en partie pour aider la contraction du myocarde qu'une PPCn est parfois administrée aux patients atteints d'insuffisance cardiaque (Degraeuwe et al. 2000, Tsagogiorgas et al. 2011, Cheifetz 2014).

En VLT, l'utilisation d'un liquide 1500 fois plus dense que l'air a soulevé beaucoup de questions quant à son impact sur le retour veineux systémique et les paramètres hémodynamiques. Il a ainsi été rapporté que l'impact était beaucoup plus important en VLT qu'en VG chez des porcelets (Degraeuwe et al. 2000). Bien que plusieurs études aient évalué les impacts hémodynamiques de la VLT chez des modèles néonataux, il restait, tout de même, des zones grises à clarifier. De plus, la théorie et les pratiques entourant la VLT ont beaucoup évolué durant les 10 dernières années et le raffinement des stratégies de ventilation

permet maintenant une meilleure gestion des volumes pulmonaires de PFC. C'est pourquoi il a été convenu de réaliser une nouvelle étude pour déterminer si la présence de PFC dans les poumons avait un impact cliniquement significatif sur le retour veineux et la stabilité hémodynamique.

Dans l'optique d'utiliser la VLT chez les extrêmes prématurés, il était important de s'assurer de maintenir un débit cardiaque constant d'abord chez des agneaux nés à terme. Ainsi, un groupe d'agneaux nouveau-nés à terme avec déficit induit en surfactant ($n = 8$) a été utilisé afin d'évaluer l'effet de l'induction de la VLT sur les paramètres hémodynamiques en comparant les valeurs immédiatement avant et après l'initiation de la VLT. Dans les travaux effectués pour cette thèse, il a été montré que **(1)** la VLT était associée à un effet subtil sur le remplissage ventriculaire gauche principalement en inspiration, et **(2)** la VLT était bien tolérée chez les agneaux avec déficit en surfactant.

6.2.1 Effet hémodynamique de la VLT

Parmi les zones grises qui persistaient en VLT, Lowe et al. avaient noté une diminution de plus de 40% du débit cardiaque chez des chats adultes. Les auteurs avaient énoncé que l'ajout du PFC dense dans les poumons pouvait possiblement comprimer le myocarde et compromettre le remplissage ventriculaire gauche (Lowe et al. 1979).

Il a été choisi d'évaluer l'impact de la VLT sur la pression veineuse centrale et les paramètres hémodynamiques associés au remplissage du ventricule gauche. Les marqueurs diastoliques précoces retenus sont i) le dp/dt négatif qui représente la dérivée de la pression ventriculaire gauche lors de la relaxation isovolumétrique en diastole et ii) le tau qui est la constante de temps de relaxation ventriculaire gauche. Pour ce qui est des marqueurs diastoliques tardifs, la pression télédiastolique du ventricule gauche (LVEDP) de même que le diamètre télédiastolique du ventricule gauche (LVEDD) ont été étudiées. Bien que d'autres marqueurs auraient pu être sélectionnés, ces derniers ont été retenus pour la disponibilité du matériel (cathéter d'haute-fidélité Millar) et leur faisabilité chez l'agneau nouveau-né. D'autres marqueurs, notamment au niveau échographique avec des mesures de doppler transmitral (rapport E/A et E/E'), auraient pu être intéressants, mais demeurent presque

impossibles à utiliser chez l'agneau dû à la physiologie de la cage thoracique qui rend difficile les mesures échographiques. À cet effet, seul le LVEDD pouvait être mesuré *via* une échographie. Cela dit, le LVEDD nous a permis d'évaluer si la dimension du ventricule gauche était influencée par la VLT. Cela n'indique pas s'il y a une défaillance au niveau du ventricule gauche, mais peut tout de même nous renseigner à savoir si la VLT influence le remplissage du ventricule gauche.

En comparant les valeurs hémodynamiques avant et après le remplissage initial de la VLT (après 1 minute de VLT), il a été montré que la phase de remplissage en VLT n'a aucun impact sur la pression veineuse centrale, tout comme sur le dp/dt négatif alors que le tau a augmenté, mais de façon non cliniquement significative. Il aurait été surprenant d'obtenir des effets associés à la VLT sur des marqueurs de fonction diastolique précoce comme le dp/dt négatif mesuré en début de diastole. Il était plutôt attendu que l'effet compressif du liquide dense dans les poumons sur le cœur arrive plus tardivement dans la diastole, alors que le volume du ventricule gauche est à son maximum. Le marqueur tau, de son côté, étant mesuré sur une plus longue période que le dp/dt négatif, aurait eu plus de chance d'être affecté par le remplissage en VLT (à 1 minute de VLT) mais il demeure tout de même précoce; il n'a été affecté que de façon subtile. Au niveau des marqueurs de fonction diastolique tardifs, la LVEDP tout comme la LVEDD n'ont pas été influencées par le remplissage initial de la VLT. De plus, ni la pression veineuse centrale ni la pression artérielle systémique (PAS) n'ont été affectées par le remplissage initial de la VLT. Ainsi, avec le maintien du débit cardiaque et de la fréquence cardiaque, il est possible de déterminer que l'initiation de la VLT, dans le modèle utilisé, n'a pas influencé le remplissage du ventricule gauche. Les résultats obtenus dans cette étude sont rassurants par rapport aux résultats précédemment obtenus par Lowe et al. où la baisse du débit cardiaque soulevait un sérieux doute quant à la sécurité de la VLT (Lowe et al. 1979).

Une des hypothèses pouvant expliquer la différence entre nos résultats et ceux publiés précédemment par d'autres équipes demeure la gestion du volume total de PFC dans les poumons. Dans les années antérieures, la technologie en VLT ne permettait pas de contrôler étroitement le volume de liquide instillé dans les poumons alors que plusieurs équipes se

contenaient de mesurer les pressions de fin d'inspiration et d'expiration ou encore estimaient le volume introduit dans les poumons (Degraeuwe et al. 2000). Il est connu que l'ajout de PFOB dans les poumons permet une amélioration de la compliance pulmonaire (Wolfson et Shaffer 2005, Sage et al. 2018). Il est possible de faire l'hypothèse qu'en maintenant des valeurs de pression constantes, le volume pulmonaire augmente graduellement. Par conséquent, l'augmentation du volume pulmonaire pourrait diminuer le retour veineux systémique et nuire au remplissage du ventricule gauche en le comprimant. Fait intéressant, Pohlmann et al. ont aussi réalisé une étude en VLT durant 24 heures chez des moutons adultes ($n = 10$) avec une détresse respiratoire sévère induite par l'acide oléique. Ils ont indiqué avoir dû retirer du PFC toutes les 1 à 2 heures jusqu'à l'obtention des collapsus pour éviter l'accumulation et prévenir la surdistension (Pohlmann et al. 2011). Ils n'ont malheureusement pas rapporté les volumes de fin d'expiration obtenus. Afin de pallier cet effet, un nouveau dogme de ventilation a été suggéré en VLT par l'équipe du Pr Tissier et l'équipe du Pr Fortin-Pellerin où l'on vise systématiquement l'EELV minimal. Cette technique est appelée : *lung protective approach*. En pratique, cela revient à s'assurer d'être toujours le plus près possible des collapsus expiratoires. À titre indicatif, la valeur d'EELV chez ces agneaux après 1 minute de VLT était de $29,1 \pm 0,5$ ml/kg. Cette façon de faire permet d'empêcher une augmentation progressive du volume de fin d'expiration qui ultimement peut mener à la surdistension en fin d'inspiration.

6.2.2 Effet de l'inspiration sur les paramètres hémodynamiques

Une analyse de l'impact des différentes phases du cycle respiratoire a été réalisée en étudiant les cycles suivant le remplissage en VLT. Les valeurs mesurées à la fin de l'inspiration et à la fin de l'expiration ont été comparées ce qui a permis de mettre en lumière une augmentation significative, mais modeste, sur la LVEDP, le tau et la pression veineuse centrale. Bien que cette augmentation soit significative d'un point de vue statistique, d'un point de vue clinique elle a été jugée peu significative alors que les variations sont demeurées dans les valeurs normales pour un agneau nouveau-né en plus d'être comparable avec les variations normalement associées à la ventilation gazeuse (Velvis et Klopfenstein 1995). Ces résultats semblent confirmer que la gestion du volume doit être faite de manière très étroite afin d'éviter des impacts plus importants. Plus faible est l'EELV (et donc le volume au début

de l'inspiration), plus faible est le volume de fin d'inspiration après instillation du V_T . Ainsi, le risque de surdistension à la fin de l'inspiration est diminué.

Les résultats sont en accord avec une étude effectuée chez des lapins adultes sains qui ne montrait pas d'effet de la VLT sur le débit cardiaque, les résistances vasculaires pulmonaires et la pression dans l'oreillette gauche (Tsagogiorgas et al. 2011). Dans l'étude présentée dans cette thèse, les résistances vasculaires pulmonaires n'ont pas été calculées. Par contre, comme le débit cardiaque et la pression artérielle pulmonaire n'ont pas été influencés par la VLT, il est possible d'assumer que la résistance vasculaire pulmonaire n'a pas été influencée par la VLT. Il sera néanmoins vraiment intéressant si possible, d'interroger les régions dépendante et non-dépendante pour voir si un changement de résistance vasculaire pulmonaire s'opère entre les deux régions avec l'instauration de la VLT. Auquel cas il serait attendu que l'ajout du liquide dense pourrait augmenter les résistances vasculaires pulmonaires dans les régions dépendantes et conséquemment aider la redistribution du sang vers les régions non dépendantes. Fait intéressant, Tsagogiorgas et al. ont, de leur côté, proposé que comme la VLT permet un meilleur recrutement alvéolaire, on diminuerait la vasoconstriction associée aux régions non ventilées et conséquemment on diminuerait la résistance vasculaire pulmonaire totale (Tsagogiorgas et al. 2011). Pour ce qui est du ventricule droit, l'étude présentée dans cette thèse n'a mis en lumière aucun impact négatif associé à la VLT alors que la pression artérielle pulmonaire n'a pas été influencée de façon significative.

Degraeuwe et al. ont également utilisé un modèle néonatal de déficit en surfactant; ils ont noté des fluctuations hémodynamiques significatives associées à la phase inspiratoire en VLT (Degraeuwe et al. 2000). Il est important de mentionner qu'ils n'ont pas effectué de gestion étroite des volumes de fin d'expiration et des volumes pulmonaires totales, ce qui a mené à trois décès par perfluorothorax. Ils ont utilisé des V_T de 15 ml/kg avec une FR de 5/min alors que nous avons utilisé des V_T de 12.6 ml/kg avec une FR de 6.5/min, ce qui est comparable. Les effets délétères qu'ils ont obtenus seraient donc plus attribuables à un EELV trop important. C'est pourquoi il est suggéré de maintenir l'EELV au minimum afin d'éviter la surdistension à la fin de l'inspiration.

En sommes, les effets hémodynamiques de la VLT demeurent légers et reste dans un intervalle jugé acceptable d'un point de vue clinique.

6.2.3 La VLT comme support respiratoire

L'objectif secondaire de cette étude était d'évaluer s'il était possible de maintenir des échanges gazeux adéquats lors de la prise en charge respiratoire de la VLT. Avant d'espérer ventiler adéquatement des agneaux extrêmement prématurés avec un système pulmonaire immature et un déficit endogène en surfactant, il fallait d'abord parvenir à le faire chez un modèle plus robuste. Suivant les lavages répétés, les agneaux avaient une gazométrie avec un pH acide ($< 7,25$), des ions bicarbonates ≈ 16 mmol/l, une $\text{PaO}_2 \approx 70$ mmHg et une $\text{PaCO}_2 \approx 60$ mmHg. C'est bel et bien l'effet qui était attendu suivant l'induction du déficit en surfactant (Lachmann et al. 1980, Vrancken et al. 2012). Ce qui est très encourageant, c'est de constater que pratiquement tous les paramètres se sont améliorés après 2 heures de VLT. Ainsi, le pH, bien que toujours acide, avait été amélioré tout comme la PaO_2 , la PaCO_2 et les ions bicarbonates. Ceci montre bien l'efficacité de la VLT pour assurer des échanges gazeux, même chez des modèles très pathologiques tels que celui présenté dans cette thèse. Ces résultats confirment des observations antérieures présentées dans la littérature au sens où cette preuve de concept avait déjà été effectuée (Hirschl et al. 1995, Pohlmann et al. 2011). Hirschl et al. ont comparé deux groupes d'agneaux VLT ($n = 6$) et VG ($n = 6$) avec détresse respiratoire sévère induite par l'acide oléique. Ils ont effectué un remplissage des poumons avec 35 ml/kg de PFC suivi de l'utilisation d'un V_T à 15 ml/kg avec une FR de 5/min. Cependant, ils ont utilisé un support extracorporel pour aider aux échanges gazeux. Ils ont, tout de même, rapporté que la qualité des échanges gazeux était supérieure dans le groupe VLT en comparaison avec le groupe VG. À titre indicatif, les paramètres utilisés dans l'étude présentée dans cette thèse étaient un remplissage de 25 ml/kg avec des V_T entre 11 et 14 ml/kg, ce qui a donné une gazométrie acceptable. Les paramètres utilisés auraient pu être associés à un besoin d'utiliser un support extracorporel, ce qui n'a pas été le cas. Avec l'algorithme de gestion des collapsus implémenté dans INOLIVENT-6, il était possible de ventiler les agneaux en étant très près du collapsus tout en s'assurant de ne pas avoir d'augmentation d'EELV au fil du temps. Dans ce sens, les résultats présentés suggèrent que

la VLT pourrait être tout à fait indiquée pour prendre en charge des agneaux extrêmement prématurés.

6.2.4 Limites de l'étude

Les agneaux avaient une acidose ($\text{pH} \approx 7,12 \pm 0,03$), qui aurait pu affecter la stabilité hémodynamique, ce qui n'a pas été le cas. Une diminution du pH artériel peut mener à une dysfonction du myocarde. La diminution du pH intracellulaire et extracellulaire affecte l'équilibre calcique et nuit à la contractilité cardiaque (Kimmoun et al. 2015). Dans l'étude présentée, l'acidose était déjà présente avant les mesures initiales et elle s'est améliorée durant la VLT. Puisque le devis d'étude utilisé était fait de façon croisée, c'est-à-dire en comparant les valeurs hémodynamiques immédiatement avant et après 1 minute de VLT, il serait étonnant que l'acidose ait influencé les résultats durant ce court laps de temps. L'acidose présente chez tous les agneaux a été associée à l'hypoxie de la patte arrière droite dont l'artère fémorale était condamnée par la présence du cathéter fémoral nécessaire aux mesures hémodynamiques par thermodilution. Une partie de cette acidose pourrait aussi être associée aux lavages pulmonaires répétés nécessaires à l'induction du déficit en surfactant. Chaque lavage était associé à une période hypoxique transitoire pouvant avoir contribué à l'acidose. En plus de contribuer à la production de lactate et à l'acidose, la perfusion de propofol devait être augmentée pour s'assurer du bien-être de l'animal. Le propofol est connu pour causer une acidose métabolique en plus d'avoir un effet inotrope négatif (Choi et al. 2014). Les agneaux ont malgré tout conservé une stabilité hémodynamique de même qu'une bonne diurèse, ce qui indique qu'ils n'étaient pas en état de choc. La mesure des variables hémodynamiques obtenues par thermodilution et par échographie n'a pas été réalisée immédiatement après le remplissage en VLT mais bien après 120 minutes pour des raisons techniques (enregistrement en continu d'autres variables comme la TIE (voir *section 6.3*)). Ceci constitue une faiblesse dans la mesure où des changements hémodynamiques auraient pu se produire entre l'initiation de la VLT et les mesures. De plus, la nécessité d'effectuer des remplissages vasculaires avec du sérum physiologique associé à la longueur de l'anesthésie (plus de 6 heures) aurait pu affecter les valeurs hémodynamiques. Cependant, la pression artérielle systémique et les autres variables hémodynamiques suivies en continu

n'ont pas varié entre le début de la VLT (1 minute de VLT) et le moment de la prise des mesures à 120 minutes.

6.2.5 Conclusion

Cette étude montre que la VLT n'affecte pas de façon cliniquement significative la pression veineuse centrale tout comme le remplissage du ventricule gauche et les paramètres hémodynamiques en général dans un modèle néonatal ovin de déficit en surfactant. Les effets mesurés étaient seulement associés à la phase inspiratoire et sans signification clinique. Les résultats différents obtenus par les études précédentes pourraient être attribués à la mauvaise gestion du volume pulmonaire total de liquide dans les poumons. Il est donc rassurant de constater qu'aucun impact hémodynamique majeur n'a été décelé en utilisant l'algorithme de ventilation présenté dans cette thèse. Les résultats obtenus devront cependant être validés chez un modèle d'agneau extrême prématuré et chez l'humain où l'association d'une immaturité respiratoire et cardiovasculaire pose des défis supplémentaires.

6.3 Discussion de l'article 2

Cette étude a été réalisée afin de préciser où se distribue le PFOB ainsi que l'air résiduel lors du remplissage en VLT. Par le passé, une période d'instabilité de la saturation artérielle a souvent été observée en lien avec un remplissage trop lent. À l'inverse, un remplissage trop rapide a soulevé, à maintes reprises, des doutes à savoir quel était l'impact de l'ajout d'un liquide incompressible dans un arbre trachéobronchique et des alvéoles contenant déjà de l'air. Qu'en était-il de cet air résiduel ? Était-il solubilisé dans le PFOB, emprisonné dans les alvéoles ou encore est-ce que l'air contenu dans la trachée et les bronches a été poussé par le PFOB dans les régions non dépendantes alors que le PFOB se distribuait dans les zones dépendantes ? L'originalité de la présente étude vient du fait qu'aucune autre étude précédente n'a évalué de façon spécifique la distribution du PFOB en VLT. L'étude a été réalisée chez un groupe d'agneaux nouveau-nés à terme avec déficit induit en surfactant ($n = 15$); un second groupe d'agneaux non ventilés a servi de contrôle pour l'analyse histologique ($n = 5$). Le modèle de déficit induit en surfactant a, une fois de plus, été utilisé afin de mimer la situation retrouvée chez les extrêmes prématurés en termes de faible compliance pulmonaire et de dé-recrutement alvéolaire.

Afin d'évaluer la distribution du PFOB et de l'air dans les poumons, la TIE et la fluoroscopie ont dû toutes deux être utilisées. Les résultats ont montré que, lors du remplissage, le PFOB était d'abord principalement distribué dans les zones dépendantes, puis secondairement dans les zones non-dépendantes. Cette période transitoire s'effectuait principalement durant les dix premières minutes de VLT après lesquelles une stabilité de la distribution du volume pulmonaire à la fin de l'inspiration ainsi que du volume de fin d'expiration était notée. La distribution préférentielle du PFOB initialement dans les régions dépendantes soulevait un doute à savoir si l'air résiduel dans les poumons n'était pas redirigé vers les zones non dépendantes avec un potentiel de surdistension alvéolaire. Or, les résultats de TIE n'ont pas montré d'augmentation du volume total dans les zones non-dépendantes; au contraire, une diminution du volume a été observée autant à l'inspiration qu'à l'expiration comparativement à la VG. De plus, aucune surdistension n'a été identifiée suivant l'analyse histologique. Cette étude a permis de mettre en lumière plusieurs caractéristiques physiologiques associées à la VLT qui n'avaient jamais été rapportées. Il est donc maintenant

possible d'affirmer que la VLT permet un recrutement alvéolaire plus homogène en terme d'EELV et de distribution du V_T .

6.3.1 Distribution du PFOB lors du remplissage initial en VLT

Afin d'étudier la distribution du volume pulmonaire, deux techniques d'imagerie médicale ont été utilisées, soit la TIE et la fluoroscopie. La TIE permet de mesurer les changements d'impédance électrique au niveau du thorax; ces changements permettent de suivre en continu et en temps réel les variations de la quantité d'air et/ou de PFOB dans les poumons. L'augmentation de l'impédance électrique est associée à plus d'air et/ou de PFOB (Adler et al. 1997). Ce n'est donc pas une mesure directe du volume mais bien un proxy qui permet d'étudier différentes régions pulmonaires et suivre l'évolution dans le temps. Il est à noter que l'impédance du PFOB et de l'air a été mesurée par un proche collaborateur (Pr. Andy Adler) et a été jugée, à toute fin pratique, comme étant identique ($< 1 \times 10^{-5}$ S/m, dans les deux cas). Cette technique a pour avantage d'être très sensible mais a aussi comme désavantage un manque de discrimination entre l'air et le PFOB. Il n'est pas possible de savoir si une région donnée contient plus ou moins de PFOB par rapport à l'air. Afin de pallier ce manque, la fluoroscopie a été utilisée. Cette technique d'imagerie par rayons X est rendue possible en VLT car le PFOB utilisé est connu pour sa radio-opacité dû à son atome de brome (Wolfson et al. 1994). En combinant les deux techniques, il a été possible d'obtenir un reflet assez fidèle de la distribution régionale du volume pulmonaire en PFOB de même que l'évolution du volume total dans le temps. Il a ainsi été montré que le volume de PFOB était principalement distribué dans les régions dépendantes lors du remplissage initial. Ce résultat était attendu puisque des études réalisées en VLP ont montré cette distribution préférentielle des zones dépendantes lors du remplissage (Quintel et al. 1998, Miller et al. 2001). En VLT, Hirschl et al., ont, pour leur part, évalué que le PFC recrutait le poumon de façon homogène par une analyse réalisée en cytodensitométrie (Hirschl et al. 1994). Leur étude, effectuée chez dix agneaux juvéniles (17.3 ± 4.2 kg) avec détresse respiratoire induite par l'acide oléique soumis à une heure de VLT ($n = 5$) ou VG ($n = 5$), a montré que le PFC était distribué de façon plus homogène dans le groupe VLT que dans le groupe VG. Dans le groupe sous VG, ils ont remarqué une ventilation principalement marquée dans les régions non-dépendantes plutôt que dans les régions dépendantes. Malgré l'importance de leur étude,

ils n'ont pas étudié la VLT de manière dynamique, en particulier pendant les premières minutes du traitement. Il était impossible de savoir ce qui était advenu de l'air résiduel dans les poumons au moment du remplissage. Déjà, Shaffer et Moskowitz (1974) avaient soulevé ce point en 1974 alors qu'ils suggéraient des manœuvres de positionnement afin de favoriser la sortie de l'air résiduel durant les premières minutes. Ils avaient aussi suggéré une hyperventilation avec une FiO_2 de 100% afin de s'assurer de retirer au maximum l'azote pouvant rester dans les poumons selon l'hypothèse que le CO_2 et l' O_2 allaient se solubiliser dans le PFC (Shaffer et Moskowitz 1974). Bien que cette théorie soit plausible, en pratique il apparaît impensable et dangereux de ventiler des patients extrêmement prématurés avec une FiO_2 de 100% alors que l'hyperoxie figure parmi les facteurs responsables du VILI (Ambalavanan et Morty 2016). Il était donc très important de bien comprendre ce qui se passe durant cette phase de remplissage afin de l'optimiser et d'éviter une désaturation majeure et/ou des dommages pulmonaires associés à une surdistension.

Dans l'étude présentée dans cette thèse, les régions antérieures (non-dépendantes) ont été recrutées progressivement par le PFOB durant les 10 premières minutes de VLT avant de se stabiliser. À l'inverse de ce qui était pensé au départ, il n'y a pas eu d'augmentation du volume pulmonaire dans les zones non-dépendantes en lien avec une redistribution de l'air. Le volume a plutôt atteint sensiblement le même niveau qu'en VG avant de redescendre après 1 minute de VLT. Cette découverte a été rassurante car elle suggère qu'il n'y a pas de surdistension alvéolaire dans les régions non-dépendante. L'analyse du score histologique a d'ailleurs montré qu'il n'y avait pas plus d'inflammation dans cette région, ce qui abonde dans le même sens.

Néanmoins, une augmentation du volume pulmonaire total immédiatement après le remplissage en VLT a été notée. Cette augmentation était principalement attribuable à l'augmentation du volume dans les régions dépendantes. Ceci pourrait s'expliquer, du moins en partie, par le modèle qui a été utilisé. Le déficit en surfactant peut affecter à la baisse l'EELV des agneaux sous VG et, par le fait même, diminuer le volume pulmonaire total. À l'inverse, en VLT, le PFOB, par sa nature, peut 1) agir comme un surfactant et diminuer la tension de surface des poumons en favorisant un meilleur recrutement alvéolaire et 2) par sa

grande densité, promouvoir le recrutement des régions dépendantes plus souvent atelectasiées chez les modèles malades (Morris et al. 2000). Ces facteurs ont donc probablement permis un meilleur recrutement alvéolaire dans les zones dépendantes et conséquemment une augmentation du volume pulmonaire global. Les résultats vont, ainsi, dans le même sens que Tooley et al. qui ont aussi montré que l'utilisation des PFC en VLT permet d'augmenter le volume de fin d'expiration tout comme la compliance dans un modèle d'atélectasie chez des chats adultes (Tooley et al. 1996). Des résultats très similaires ont aussi été obtenus par Gauger et al. dans une étude réalisée en VLP chez des moutons adultes (Gauger et al. 1998). Bien que cette étude ait été réalisée en VLP, il est possible de faire le parallèle entre le recrutement des régions dépendantes en VLT et en VLP si seulement la phase de remplissage initial est comparée. L'augmentation du volume dans les régions dépendantes n'a pas non plus été associée à plus d'inflammation pulmonaire lors de l'analyse histologique. Au contraire, les résultats histologiques montrent un effet protecteur de la VLT dans ces régions. Ceci pourrait s'expliquer par la diminution des dommages pulmonaires induits par les forces de cisaillement que subissent les alvéoles soumis à une ouverture et fermeture répétée. Ce phénomène, appelé atelectrauma, peut être à la base du VILI chez des individus avec déficit en surfactant ou encore chez des patients ventilés avec une PEEP trop faibles pour assurer un EELV nécessaire au maintien des alvéoles ouvertes (Bhatia et al. 2017).

Ainsi, le PFOB se distribue principalement dans les régions dépendantes lors de l'initiation de la VLT avant de se redistribuer, de façon homogène, entre les zones dépendantes et non dépendantes durant les 10 premières minutes. L'augmentation du volume total associé à un recrutement des zones dépendantes n'est pas associée à des effets délétères évalués par histologie.

6.3.2 Évolution du volume de PFOB entre 10 et 120 minutes de VLT

Alors que les zones dépendantes étaient bien recrutées dès la fin du remplissage initial par le PFOB, dans les régions non-dépendantes le recrutement a pris 10 minutes avant d'atteindre un niveau similaire à ce que les agneaux avaient en gazeux avant la VLT. Aucune différence n'a été mesurée entre la 10^e et la 120^e minute avec la TIE et la fluoroscopie

suggérant que le recrutement avait lieu principalement dans les 10 premières minutes. Cependant, il est impossible d'affirmer avec certitude l'absence d'un recrutement progressif qui n'aurait pas été décelé par les techniques utilisées. La distribution du volume total était cependant toujours plus homogène en VLT qu'en VG après 120 minutes, résultat en accord avec ce que Hirschl et al. avaient noté dans leur évaluation post-mortem après 1 heure de VLT en comparaison avec la VG (Hirschl et al. 1994). Les limites intrinsèques à l'utilisation de la TIE et la fluoroscopie seront discutées dans la section « Limites de l'étude » (*section 6.3.5*).

6.3.3 Évaluation de la distribution du V_T en VLT

Pour la première fois, l'étude présentée dans cette thèse a montré que le V_T était distribué de façon plus homogène en VLT qu'en VG. En VG, chez des modèles animaux avec détresse respiratoire tout comme chez les humains, le V_T a plutôt tendance à se distribuer dans les régions non-dépendantes (Riedel et al. 2009). C'est également ce qui a été observé chez les agneaux avec déficit en surfactant lors de la VG initiale (pré-VLT) présentée dans cette étude. Or, il a clairement été montré que, dès l'instauration de la VLT, le résultat était complètement inversé; le V_T était distribué de façon plus homogène entre les régions dépendantes et non-dépendantes et ce dès la première minute de VLT. Cette distribution plus homogène du V_T , donc du recrutement alvéolaire, est probablement responsable, au moins en partie, de l'amélioration des échanges gazeux en VLT rapportée à maintes reprises dans la littérature (Hirschl et al. 1995, Pohlmann et al. 2011).

6.3.4 Évaluation de la perfusion pulmonaire

Plusieurs études, principalement effectuées en VLP, ont montré que l'introduction du PFC dans les poumons permet de redistribuer le sang des zones dépendantes vers les zones non-dépendantes. Ce phénomène, par lequel le PFC très dense comprime les vaisseaux sanguins et force la redistribution du sang vers les régions non-dépendantes, expliquerait l'amélioration des rapports ventilation/perfusion régionaux associés à la VLP (Doctor et al. 1998, Hood et Modell 2000, Harris et al. 2002). En VLT, ceci n'avait jamais été démontré. Dans l'étude effectuée pour cette thèse, la redistribution de la perfusion sanguine n'a pas été

jugée significative. Cela dit, en l'associant à une distribution plus homogène des V_T , les résultats obtenus suggèrent un meilleur rapport V/Q dans les zones dépendantes et non-dépendantes en VLT qu'en VG. Ce résultat est potentiellement très important chez les prématurés souffrant de MMH. En effet, dans cette situation la perfusion a tendance à se distribuer dans les régions dépendantes alors que le V_T est principalement distribué dans les zones non-dépendantes, contribuant à obtenir un rapport V/Q médiocre (Lakshminrusimha 2012). D'autres études seront cependant nécessaires afin de confirmer que la VLT est vraiment associée à un meilleur rapport V/Q chez les extrêmes prématurés. Il serait aussi intéressant à ce moment, d'évaluer les résistances vasculaires pulmonaires afin d'évaluer si l'amélioration de la perfusion dans les régions non dépendantes se fait au détriment d'une augmentation de la résistance vasculaire des régions dépendantes.

6.3.5 Limites de l'étude

Le modèle de déficit en surfactant induit par des lavages répétés au sérum physiologique présente l'avantage d'induire une détresse respiratoire assez reproductible d'un agneau à l'autre. Cependant, seulement près de 50% du sérum physiologique peut être récupéré entre chaque lavage. Bien qu'une partie du sérum physiologique soit absorbée par les poumons et éliminée par évaporation lors de la VG pré-VLT, il reste définitivement du sérum physiologique dans les poumons (Courtice et Phipps 1946). Le sérum physiologique résiduel contient des électrolytes pouvant potentiellement affecter l'impédance électrique mesurée par la TIE. Cependant, si tel était le cas, une diminution de l'impédance (moins de volume) dans les zones dépendantes aurait dû être observée. A l'inverse, une forte augmentation de l'impédance dans les zones dépendantes a été observée, ce qui signifie une augmentation de volume dans cette région. Ceci suggère que le sérum physiologique résiduel n'a pas influencé le recrutement des zones dépendantes. De plus, les mesures ont toutes été effectuées après l'induction du déficit en surfactant ce qui aurait pu influencer les résultats pré et post initiation de la VLT mais de la même façon. Cela limite le biais possible entre les deux prises de mesures.

Les mesures de perfusion pulmonaire ont été obtenues par une technique qui consiste à injecter 2 ml de sérum salé hypertonique (7%) dans la voie veineuse centrale à chaque

mesure. Le sérum salé agit comme agent de contraste puisqu'il influence fortement l'impédance électrique (Borges et al. 2012). L'ajout de sérum salé hypertonique peut donc influencer la mesure d'impédance à la baisse qui peut être interprétée par une diminution du volume pulmonaire. Les prises de mesure étant les plus à risque d'avoir été influencées sont les mesures à 5, 10 et 120 minutes. Afin de minimiser les impacts, les injections de sérum salé hypertonique étaient toujours effectuées après les enregistrements de TIE servant à évaluer le volume. Il est très peu probable que les valeurs à 120 minutes aient pu être influencées par les injections effectuées après 10 minutes de VLT. D'ailleurs, les résultats à 120 minutes étaient très similaires à ceux obtenus à 10 minutes. Certaines valeurs de ventilation ont, par conséquent, été rapportées en pourcentage du signal global afin de minimiser au maximum ce biais.

Une des limites de l'étude est en lien avec fluoroscopie et la TIE utilisées pour évaluer la distribution du volume d'air et de PFOB. La fluoroscopie, comme tout appareil d'imagerie, peut, à un certain moment, voir son signal être saturé de sorte que certaines variations peuvent ne pas avoir été perçues. La TIE, pour sa part, bien que très puissante, peut tout de même voir ses valeurs influencées dans le temps. Puisqu'elle dépend essentiellement de l'impédance, il est possible d'imaginer qu'un changement de concentration des différents électrolytes du sang puisse avoir modifié l'impédance totale et, par conséquent, influencer les mesures de volume pulmonaire absolu.

6.3.6 Conclusion

La phase de remplissage initial en VLT est une période dynamique qui implique plusieurs changements physiologiques. D'abord, le PFOB est préférentiellement distribué dans les zones dépendantes lors de l'initiation de la VLT. Ensuite, le PFOB se redistribue de façon homogène entre les zones dépendantes et non-dépendantes dans les dix premières minutes après l'initiation de la VLT. La démonstration que la distribution des V_T est plus homogène dès le remplissage en VLT constitue une première preuve dans le domaine. Cette distribution des V_T plus homogène associée à la perfusion pulmonaire qui n'a pas été influencée par la VLT a contribué à obtenir un rapport V/Q plus homogène en VLT qu'en VG.

6.4 Discussion de l'article 3

L'originalité de cette étude vient du fait qu'elle s'intéresse principalement à l'impact de la VLT sur l'inflammation pulmonaire. Pour la première fois, l'étude est centrée sur la comparaison de deux niveaux de V_T et FR et leur impact sur l'inflammation pulmonaire. À ma connaissance, aucune autre équipe n'a effectué une étude similaire sans avoir recours à d'autres supports respiratoires en plus de la VLT. En prévision d'une future étude clinique sur des extrêmes prématurés, il est important d'avoir en main tous les éléments nécessaires afin de maximiser les chances de succès. Comme première étape préclinique, une étude a donc été réalisée en utilisant 16 agneaux nouveau-nés sains sous VLT pendant 4 heures avant d'être sevrés en respiration spontanée durant 4 heures suivant un protocole standardisé. Un groupe de 5 agneaux non-ventilé a aussi été utilisé comme contrôle pour l'analyse histologique et RNomique. Les agneaux expérimentaux ont été randomisés ($n = 8$ par groupe) soit dans le groupe grand V_T (H- V_T : V_T à 20 ml/kg et FR à 5 /min) ou dans le groupe petit V_T (L- V_T : V_T à 10 ml/kg et FR à 10 /min). Suivant le sevrage standardisé de 4 heures, des prélèvements pulmonaires ont été effectués dans les zones dépendantes (postérieures durant la VLT) et non-dépendantes (antérieures durant la VLT) afin d'obtenir un score histologique d'inflammation et doser des ARNm associés au VILI. Contrairement à l'hypothèse du départ comme quoi la VLT à plus faible V_T serait associée à moins d'inflammation, les résultats d'RNomique suggèrent que la VLT utilisée à plus grand V_T est associée à une plus faible expression des gènes inflammatoires. Aucune différence statistiquement significative n'a cependant été mesurée entre les scores histologiques des deux groupes expérimentaux. De plus, les résultats obtenus ont montré qu'il était possible de ramener en respiration spontanée des agneaux nouveau-nés en moins de 2 heures post-VLT de manière systématique, une première dans le domaine. Aucune différence statistiquement significative n'a d'ailleurs été décelée entre les deux groupes durant les étapes du sevrage. Ces résultats suggèrent que la VLT ne nuit pas à l'intégrité pulmonaire au point d'empêcher le retour en respiration spontanée, ce qui est encourageant pour la suite chez les grands prématurés.

6.4.1 Inflammation en lien avec les modalités de VLT

Le but premier de l'étude était de comparer l'expression de gènes inflammatoires entre les deux groupes à l'étude. Dans un premier temps, 3 gènes principaux (*IL1B*, *IL6* et *TNF* (codant pour la protéine TNF-alpha) ont été sélectionnés pour leur implication dans l'inflammation pulmonaire en lien avec le VILI (Ganter et al. 2008, Moldoveanu et al. 2008, Huusko et al. 2014). Leur ARNm a été dosé par PCR quantitative (RT-qPCR) et comparé. Ensuite, une étude exploratoire a aussi été réalisée pour doser l'expression de 12 autres gènes afin de comparer les profils d'expression en lien avec les deux techniques de ventilation. Finalement, un score histologique a été obtenu afin d'évaluer la réponse inflammatoire alvéolaire. Cette section s'attardera aux différentes analyses qui ont été réalisées.

6.4.1.1 *IL1B*, *IL6* et *TNF-α*

Les gènes codant pour l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α étaient donc les principales cibles étudiées pour évaluer l'inflammation chez nos agneaux. Ainsi, une plus grande expression de chacun de ces marqueurs est associée à un moins bon pronostic respiratoire. Puisque le développement de la DBP est en partie liée à l'inflammation causée par le VILI, il faut s'assurer d'utiliser les paramètres qui limitent le VILI au maximum (Jobe 2015). Avant la réalisation de l'étude présentée dans cette thèse, seuls Jiang et al. ont accompli une étude qui comparait deux niveaux de V_T liquidien. Ils ont comparé l'influence d'une VLT avec des V_T de 6 ml/kg et de 25 ml/kg sur l'expression des gènes *IL6* et *IL8* chez des porcelets. Leurs résultats suggèrent que l'utilisation de la VLT à plus faible V_T cause moins d'expression d'*IL6* et d'*IL8* autant pour les ARNm que les protéines sériques (Jiang et al. 2017). Le recours à une technique d'épuration du CO₂ extracorporelle leur a permis d'utiliser des V_T qui ne seraient pas suffisamment élevés lors d'une VLT destinée à assurer seule les échanges gazeux. Aucune autre étude en VLT n'a utilisé des V_T aussi faibles chez des modèles néonataux. Ceci pourrait expliquer l'écart avec les résultats obtenus et présentés dans cette thèse. En effet, les résultats obtenus dans cette thèse suggèrent que la VLT à V_T élevé (20 ml/kg) est associée à un profil inflammatoire plus favorable que la VLT à faible V_T (10 ml/kg). L'expression du gène codant pour l'IL-1 β était plus élevée dans le groupe L- V_T en comparaison avec le groupe H- V_T . Une différence non statistiquement significative a été mesurée pour l'expression des gènes *IL6* et *TNF*; ceci pourrait être relié à la petite taille des

groupes qui n'a pas permis de faire ressortir des différences faibles. D'un autre point de vue, il est aussi possible que la faible différence d'expression entre les deux groupes (H-V_T et L-V_T) soit relié au fait que l'utilisation des deux modalités de VLT n'a pas de conséquence importante sur l'inflammation. Cette hypothèse est en accord avec les faibles différences retrouvées entre les scores histologique d'inflammations. Les résultats obtenus ne vont pas dans le sens de l'hypothèse initiale qui prétendait que la VLT à faible V_T entraîne moins d'inflammation. Ceci sera discuté à la *section 6.4.3.4*.

Finalement, les deux groupes expérimentaux ont montré des expressions plus élevées que le groupe contrôle non ventilé. Ceci n'est pas surprenant puisque toute intubation et ventilation mécanique est associée à un minimum d'inflammation (Puyo et Dahms 2012).

6.4.1.2 Études exploratoires des profils d'expression

Dans un deuxième temps, une étude exploratoire a été effectuée afin de faire ressortir les profils d'expression entre les deux groupes à l'étude. Douze gènes (*AGER*, *CCL4*, *CSF2*, *CXCL1*, *CXCL8*, *ICAM1*, *IL1A*, *IL1R1*, *IL33*, *NFKB1*, *NFKB2* et *TNRRSF1A*) ont ainsi été ajoutés à l'étude dus à leur implication dans le VILI (Moldoveanu et al. 2008). Afin de faire ressortir les nuances entre l'expression des gènes pour chaque agneau, il a été convenu d'appliquer une représentation par classification hiérarchique de même que de faire une analyse en composantes principales (ACP).

Représentation par classification hiérarchique :

La représentation hiérarchique a permis de mettre en lumière quatre découvertes à partir des résultats d'RNomique : (1) les profils d'expression sont plus inflammatoires dans les deux groupes expérimentaux en comparaison avec les agneaux non ventilés du groupe contrôle. Tel que mentionné précédemment, il aurait été étonnant de constater l'inverse alors que l'intubation et la ventilation mécanique sont toujours associées à une inflammation. Les agneaux ont été ventilés en VG durant au moins 1 heure avant d'être passés en VLT pour 4 heures puis de nouveau ventilés en VG pour une durée variable (entre 40 et 80 minutes). Il est donc normal qu'on décèle plus d'inflammation chez les groupes expérimentaux (Puyo et Dahms 2012). (2) Trois classes ont été identifiées. La classe 1 regroupe uniquement le gène

AGER qui, de manière générale, a été très peu transcrit chez tous les agneaux à l'exception de deux agneaux du groupe contrôle. Cela est vrai autant pour les régions antérieures (non-dépendantes durant la VLT) que postérieures (dépendantes durant la VLT), ce qui indique que ce n'est pas seulement une erreur de mesure. Il est très curieux de constater qu'*AGER* a été surexprimé de façon draconienne chez seulement deux individus non ventilés. Ceci pourrait être associé à une condition préexistante chez ces deux agneaux alors qu'*AGER* est normalement associé au dommage pulmonaire (Oczypok et al. 2017). Cela dit, un profil plus inflammatoire aurait dû être obtenu chez ces deux agneaux, ce qui n'a pas été le cas, tous les autres gènes étant sous-exprimés. Les classes 2 et 3 ont des profils inflammatoires différents où il apparaît clairement que le groupe L-V_T tend à avoir un profil qualitatif plus inflammatoire que les groupes H-V_T et contrôle. (3) Un effet différentiel des modalités de VLT a été observé entre les groupes expérimentaux. Ainsi, plutôt que d'obtenir une plus grande expression dans un groupe comparé à l'autre, les profils retrouvés vont dans le sens inverse. Par exemple, le gène *IL33* est surexprimé dans le groupe H-V_T alors qu'il est littéralement sous-exprimé dans le groupe L-V_T. Il est notable que l'*IL-33* peut agir de façon pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire selon l'environnement dans lequel elle se trouve (Zhao et Zhao 2015). Cet aspect va devoir être approfondi dans des études futures afin de voir comment les deux modalités de ventilation peuvent influencer de façon aussi hétérogène l'expression des gènes. (4) Finalement, l'expression des gènes semble avoir été plus influencée (plus de changement d'expression par rapport aux gènes rapporteurs) dans les régions postérieures (dépendantes durant la VLT) que dans les régions antérieures (non-dépendantes durant la VLT). Dans l'étude sur la distribution du PFOB en VLT (*section 6.3.3*), il a été montré que le V_T était distribué de façon plus homogène, tout comme l'EELV. Il serait donc étonnant que cette différence d'expression des gènes soit associée à la VLT. Par contre, cette différence pourrait être due au poids du liquide qui, malgré une distribution homogène dans les poumons, soumet les alvéoles des zones dépendantes à une plus grande pression hydrostatique.

En somme, bien que de nature exploratoire, l'analyse effectuée à partir de la classification hiérarchique montre qu'il y a un effet de la VLT sur l'expression des gènes inflammatoires. Cet effet est différent selon la modalité de VLT utilisée et devra être

approfondi dans de futures études. Néanmoins, à notre connaissance, l'étude présentée dans cette thèse est celle qui a exploré l'expression du plus grand nombre de gènes au niveau pulmonaire en lien avec la VLT.

Analyse en composantes principales :

En plus de la classification hiérarchique, l'ACP a été rassurante en montrant que les résultats étaient constants entre les différents groupes. Ceci permet d'assurer que les valeurs obtenues ne sont pas seulement associées à des erreurs de mesure. En effet, à la lumière du graphique d'ACP, il est possible de constater que les 3 groupes ont tous des profils semblables entre eux. Une grande hétérogénéité intragroupe se serait traduite par une dispersion beaucoup plus marquée des individus de chaque groupe sur le graphique. Par exemple, tous les individus du groupe contrôle sont concentrés en un même point ce qui témoigne d'une homogénéité dans les profils d'expression. Il y a très peu de différence entre les zones antérieures (non-dépendantes durant la VLT) et postérieures (dépendantes durant la VLT), ce qui révèle une homogénéité de la réponse inflammatoire entre les deux zones.

Ces découvertes vont devoir être approfondies dans des recherches futures afin de bien comprendre les mécanismes qui expliquent les différents profils d'expression mis en lumière dans l'étude présentée dans le cadre de cette thèse. Elles constituent tout de même un bon point de départ.

6.4.1.3 Score histologique

L'analyse des tissus prélevés dans les zones antérieures et postérieures des poumons a permis de constater, une fois de plus, que les deux groupes expérimentaux avaient un score d'inflammation plus élevé que les agneaux du groupe contrôle (Puyo et Dahms 2012). La différence était principalement associée à l'épaisseur des septa alvéolaires, suggérant une infiltration cellulaire ou encore une accumulation d'exsudat. Une étude a déjà mentionné, par le passé, que l'effet anti-inflammatoire du PFC pourrait être dû au fait que les cellules et les molécules inflammatoires n'y sont pas miscibles (Shashikant et al. 2005). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que la présence du PFC limite la desquamation des pneumocytes et empêche la relâche de molécules pro-inflammatoires dans l'espace intra-alvéolaire.

L'accumulation extra-alvéolaire de molécules pro-inflammatoires pourrait provoquer un épaississement des septa. Le PFC pourrait ainsi apporter une certaine protection pour les alvéoles. Dans l'étude effectuée pour cette thèse, il est clair qu'après 4 heures de sevrage il restait toujours du PFC dans les alvéoles. Le PFC restant était bien visible lors du prélèvement des poumons à la nécropsie alors qu'il était possible d'observer du PFC s'échapper par la trachée. De plus, l'absence d'infiltration cellulaire significative dans les deux groupes à l'étude pourrait avoir un lien avec la présence de PFC dans les alvéoles qui auraient empêché l'infiltration. Après l'augmentation de la production d'*IL-1 β* , il était possible de s'attendre à une infiltration massive de neutrophiles dans les alvéoles qui aurait dû avoir lieu dans la durée de l'étude. Cette cytokine pro-inflammatoire, très puissante, est associée à l'augmentation de la perméabilité épithéliale de même qu'au recrutement des neutrophiles (Timmermans et al. 2013). Or, cela ne semble pas être le cas, étant donnée l'absence d'infiltration décelée. De plus amples études devront être réalisées afin d'évaluer comment le système immunitaire pulmonaire réagit à la présence de PFC dans les alvéoles. Finalement, l'absence d'hémorragie et de desquamation épithéliale est une bonne nouvelle permettant de constater que la VLT ne détériore pas l'intégrité pulmonaire après 4 heures suivi d'un sevrage de 4 heures.

6.4.2 Ventilation minute et inflammation ?

Il est étonnant a priori de trouver un profil inflammatoire défavorable à l'utilisation d'un faible V_T en VLT. Les études effectuées en VG démontrent en effet l'inverse (Ciuffini et al. 2018, Farrell et al. 2018). Une recherche d'explications a donc été faite à partir des résultats obtenus. Un des éléments qui est ressorti a été le besoin d'utiliser une ventilation minute 50% plus élevée chez les agneaux du groupe L- V_T en comparaison avec les agneaux du groupe H- V_T pour maintenir la gazométrie artérielle dans les cibles établies. Ceci serait attribuable à la faible diffusion des gaz dans les PFC (comme le PFOB) comparativement à la diffusion dans un milieu purement gazeux (Costantino et Fiore 2001). Cet effet pourrait aussi être amplifié chez l'agneau où la longueur du cou augmente le volume mort anatomique par rapport au nourrisson humain (Albertine 2013), ce qui diminue la ventilation alvéolaire.

Un des facteurs qui a aussi possiblement limité l'inflammation obtenue est l'utilisation d'une stratégie à faible EELV. Cette stratégie permet en fait de s'assurer que,

même à la fin de l'inspiration, on limite le risque de surdistension. À titre indicatif, Jiang et al., qui ont montré que l'utilisation d'un grand V_T (25 ml/kg) était associée à plus d'inflammation en VLT en comparaison avec un petit V_T (6 ml/kg), n'ont pas rapporté l'EELV alors qu'ils ont mentionné l'avoir mesuré. Il est alors possible de poser l'hypothèse que leur EELV ait augmenté dans le temps causant du volutrauma chez le groupe avec un V_T de 25 ml/kg. Ceci amène possiblement l'explication du pourquoi ils ont obtenu des résultats différents de ceux présentés dans cette thèse.

Kohlhauer et al. ont également apporté un nouveau regard sur la question en montrant l'importance de maintenir un EELV à des valeurs aussi faibles que 15 ml/kg afin de limiter le VILI induit par la VLT. Ceci dit, les résultats ne sont pas directement transposables chez l'agneau nouveau-né alors qu'eux ont utilisé des porcelets, des porcs adultes et des chimpanzés adultes (Kohlhauer et al. 2019). Selon l'expérience acquise en laboratoire, il n'est pas possible de maintenir un EELV inférieur à 30 ml/kg chez l'agneau. En visant systématiquement l'EELV le plus faible possible, les valeurs d'EELV obtenues après 4 heures de VLT étaient en moyenne de 35 ml/kg et ce indépendamment du V_T utilisé. Les résultats de Kohlhauer et al. demeurent néanmoins une piste intéressante qui abonde dans le même sens que nos résultats suggérant aussi de maintenir l'EELV au minimum.

L'inflammation supérieur obtenu dans le groupe à faible V_T pourrait aussi être attribuable à la FR plus élevée chez le groupe L- V_T . En VG, l'utilisation d'une FR élevée a été associée à des dommages pulmonaires causés par le stress induit par les forces de cisaillement (Hotchkiss et al. 2000, Vaporidi et al. 2008, Chen et al. 2015). C'est d'ailleurs ce qu'ont démontré Vaporidi et al. (2008) chez un modèle murin alors qu'un faible FR était associé à moins de déformation des alvéoles et conséquemment moins d'inflammation (Vaporidi et al. 2008). Par ailleurs, l'utilisation d'un liquide incompressible fait aussi en sorte qu'à chaque changement de phase (inspiration vers expiration et inversement), le changement abrupt de direction du débit pourrait être associé à une onde de choc. Cette onde de choc peut facilement se transmettre à toutes les structures pulmonaires y compris les alvéoles (Zignego et al. 2010). L'impact potentiel de cette onde de choc n'est pas connu alors qu'en VG elle n'est pas directement transmise, mais plutôt absorbée par la compression de l'air. Le fait que, pour une même durée de VLT, les agneaux du groupe L- V_T aient été soumis

à deux fois plus de chocs, peut contribuer à expliquer une plus grande expression des gènes inflammatoires étudiés dans le groupe L-V_T.

6.4.3 Retour en respiration spontanée post-VLT

Dans la littérature, des données très limitées portent sur le sevrage post VLT chez des modèles néonataux. Dans un projet précédemment effectué dans le cadre de mes études de maîtrise en physiologie, un groupe de 6 agneaux suivant une VLT en traitement du syndrome d'aspiration méconiale a été sevré. Or, l'extubation s'effectuait entre 17 et 20 heures post VLT et les agneaux avaient besoin d'une FiO₂ de $34 \pm 10\%$ après 36 heures post-extubation. Les résultats n'ont malheureusement jamais été publiés. En 1994, Jackson et al. ont sevré trois primates nouveau-nés presque à terme après 5 heures de VG suivant une VLT de 3 heures (Jackson et al. 1994). De leur côté, Stavis et al. ont rapporté avoir sevré 3 agneaux à terme après 4 heures de VLT. L'extubation a été effectuée après 16 heures (Stavis et al. 1998). Dans l'étude effectuée pour cette thèse, il a été montré qu'il était possible de sevrer systématiquement les agneaux en moins de 2 heures après une VLT de 4 heures ce qui constitue une première dans la littérature. Ceci est encourageant en vue des extrêmes prématurés où il faut s'assurer que la VLT ne compromette pas le retour en respiration spontanée. Il existe tout de même un besoin en O₂ avec un léger tirage persistant chez la majorité de nos agneaux durant les 4 heures du sevrage. Il aurait été intéressant de suivre l'évolution de cette demande en O₂ dans le temps. Ceci dit, la tendance se voulait plutôt rassurante avec une diminution de la FiO₂ dans le temps.

6.4.4 Limites de l'étude

Une des limites de l'étude est la faible taille des groupes. Une taille d'échantillon plus grande aurait pu permettre de mettre en lumière davantage de différences entre les deux groupes, notamment pour l'expression des gènes *IL6* et *TNF*. Ensuite, il a été décidé d'effectuer un sevrage après la VLT afin d'évaluer si les deux modalités avaient un impact clinique sur le retour en respiration spontanée suivant la VLT. Or, l'étape de sevrage peut avoir causé de l'inflammation. Ainsi, il est possible qu'une partie de l'inflammation mesurée soit plutôt associée au sevrage post-TLV qu'à la VLT en soi. Ceci dit, l'absence de différence

entre les deux groupes lors du sevrage est rassurante. Tous les agneaux ont été sevrés de façon constante à l'exception d'un seul qui avait reçu trop de sédation. Cela suggère que l'ajout du sevrage au protocole effectué ne vient pas invalider les conclusions qui peuvent être tirées. L'agneau qui n'a pas été extubé et qui, par conséquent, a été soumis à une ventilation invasive plus longue, était dans le groupe H-V_T. Il n'a donc pas contribué à augmenter l'inflammation dans le groupe L-V_T associé à un profil plus inflammatoire.

À ce jour, l'agneau demeure un des modèles de choix pour les études portant sur le système cardiovasculaire (Albertine 2012). Toutefois, l'agneau, comme tous les modèles, n'est pas parfait. Les différences anatomiques et génétiques limitent l'extrapolation des résultats à l'humain. Il apparaît évident qu'une confirmation des résultats obtenus devra être ultimement validée chez l'homme.

Le dosage des ARNm a été choisi dans cette étude en tant que point de départ pour évaluer l'inflammation. Cependant, l'augmentation de la production d'ARNm n'est pas toujours synonyme d'une augmentation de la production de protéines. Il faut que les ARNm soient traduits puis maturés (maturation post-traductionnelle) avant d'être fonctionnels et avoir un effet biologique. Il aurait été très intéressant de doser aussi les protéines pour avoir un reflet plus global de l'expression des gènes étudiés. L'étude présentée dans cette thèse demeure tout de même un excellent point de départ puisque la première étape pour mesurer l'expression des gènes demeure le dosage des transcrits.

Le sevrage post-VLT a été évalué sur une période de seulement 4 heures. Il aurait été très intéressant de suivre le devenir respiratoire et inflammatoire de ces agneaux sur une période beaucoup plus grande allant jusqu'à 72 heures. Les résultats ont montré la possibilité de sevrer rapidement (en moins de 2 heures) les agneaux après une VLT de 4 heures, sans atteinte respiratoire. Bien que très encourageant, ceci reste une courte durée pour évaluer l'intégrité pulmonaire. Puisqu'il restait du PFOB lors de la nécropsie, est-ce que ce PFOB a limité la réponse inflammatoire tout en prévenant l'atélectasie durant la durée de l'étude ? Cette question demeure sans réponse alors qu'il est impossible de savoir si les agneaux auraient continué à bien aller durant les heures suivant le sevrage alors que le PFOB

s'évapore laissant place à un possible déficit en surfactant induit par 1) le va-et-vient de PFOB durant la VLT et 2) l'inflammation pulmonaire. La VLT n'est cependant pas reconnue pour interagir avec le surfactant pulmonaire (Calderwood et al. 1975). L'analyse histologique n'a pas non plus révélé d'infiltration leucocytaire, bien que cela ne témoigne en rien de ce qui aurait pu arriver dans les heures suivant le sevrage. D'une façon rassurante, Kohlhauer et al. ont sevré des porcelets, des porcs adultes et des chimpanzés sans déceler de détérioration dans les heures suivant le sevrage de la VLT (Kohlhauer et al. 2019). Bien que les modèles animaux utilisés étaient différents et que la VLT était réalisée sur une durée de 30 minutes en comparaison avec 240 minutes, leurs résultats demeurent rassurants. Quoiqu'il en soit, les résultats présentés dans cette thèse sont très encourageants, dans la mesure où les agneaux ont été sevrés en respiration spontanée sans atteinte inflammatoire majeure.

6.4.5 Conclusion

À la lumière des résultats obtenus, il semblerait que la VLT avec des V_T de 10 ml/kg et des FR de 10/min soit associée à davantage d'inflammation. Par conséquent, dans l'optique d'utiliser la VLT chez des agneaux extrêmement prématurés, il est recommandé de prioriser des V_T plus élevés (15-20 ml/kg) avec des FR plus faibles (autour de 5/min). Ceci dit, le fait d'avoir pu sevrer complètement les agneaux des deux groupes sans aucune différence démontre que la VLT, peu importe la modalité, n'a pas compromis le sevrage en respiration spontanée. Ces résultats sont donc très importants alors qu'ils continuent à préparer le transfert de la VLT vers la clinique.

CHAPITRE 7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans le cadre des études doctorales présentées dans ce document ont permis de mettre en place les fondations nécessaires à la suite des études en VLT chez les extrêmes prématurés. Premièrement, l'étude portant sur l'impact de la VLT sur les paramètres hémodynamiques a permis d'établir que la VLT n'est pas associée à un impact cliniquement significatif sur le retour veineux systémique et les paramètres hémodynamiques dans un modèle de déficit induit en surfactant. Ceci permet donc d'envisager l'utilisation de la VLT chez des agneaux extrêmement prématurés avec un déficit endogène en surfactant sans problème hémodynamique. Ensuite, dans le deuxième projet réalisé, l'évaluation de la distribution de l'air et du PFOB durant le remplissage initial en VLT a permis de clarifier la dynamique de cette phase. La démonstration de l'absence de surdistension dans les régions non dépendantes, ajoutée au V_T distribué de façon plus homogène en VLT qu'en VG, constitue une première dans la littérature. Finalement, la troisième étude portant sur la relation entre V_T et inflammation pulmonaire a permis d'établir qu'il n'était pas nécessaire de miser sur un V_T bas (10 ml/kg) [avec conséquemment une FR élevée (10/min)] pour limiter l'inflammation. Il est plutôt recommandé d'utiliser un V_T plus grand (20 ml/kg) [avec conséquemment une FR plus basse (5/min)] sur un EELV le plus bas possible (≈ 35 ml/kg). Quel que soit le V_T , il a cependant été montré qu'il est possible de ramener les agneaux en respiration spontanée en moins de 2 heures après la VLT. Ce résultat, à lui seul, est très important, car il permet d'envisager ultimement un transfert à la clinique.

Perspectives

Bien que les études présentées dans cette thèse constituent une avancée majeure dans la compréhension de la physiologie derrière la VLT, il reste encore beaucoup de travail à faire avant le transfert de la VLT dans les unités de soins intensifs néonataux.

D'abord, il sera important d'utiliser la VLT chez des modèles d'extrêmes prématurés avec un vrai déficit primaire en surfactant, et non pas un modèle d'agneau à terme avec un déficit induit en surfactant. Ceci permettra de s'assurer que dans un modèle mimant réellement une situation clinique 1) la VLT puisse prendre en charge la respiration en

assurant des échanges gazeux adéquats et 2) la VLT puisse limiter l'inflammation pulmonaire en comparaison avec la VG. La réponse inflammatoire pulmonaire causée par la ventilation mécanique chez les extrêmes prématurés est un élément très important du développement de la DBP.

Les études présentées dans le cadre de cette thèse ont été effectuées sur des VLT de 4 (article 3) et 5 heures (article 1 et 2). Or, les extrêmes prématurés ont généralement besoin du support respiratoire pendant plusieurs heures voire plusieurs jours. L'hypothèse de travail actuelle est que la VLT peut permettre d'adoucir la transition périnatale en diminuant la tension de surface des poumons *via* le PFOB tout en permettant la production et la relâche de surfactant endogène. Ceci dit, le temps nécessaire sous VLT pour permettre la production de surfactant endogène et empêcher l'établissement de la MMH reste inconnu. De même, l'impact d'une VLT effectuée sur de longues périodes allant jusqu'à plusieurs jours est inconnu. Bien que sur les périodes étudiées la VLT ne semble pas compromettre l'intégrité pulmonaire, il sera intéressant de voir les effets à long terme. En effet, en visualisant le poumon rempli de PFOB comme étant une colonne d'eau, il est possible de s'imaginer que les alvéoles dans les zones dépendantes sont soumises à une plus grande pression hydrostatique qui pourrait être délétère avec le temps. D'un point de vue d'ingénierie, il sera aussi important de s'assurer que l'algorithme de gestion de l'EELV permette de suivre le volume pulmonaire sur d'aussi longues périodes sans dérive.

L'utilisation de la VLT, tel que présenté dans ces travaux, est effectuée avec un mode de contrôle en volume. Ainsi, l'EELV est toujours maintenu à la valeur la plus basse possible, à la limite des collapsus expiratoires. Les pressions mesurées à l'entrée du tube endotrachéal sont toujours négatives à la fin de l'expiration. La question est de savoir si les zones non dépendantes sont réellement soumises à une pression négative. En principe, la présence du PFOB dans les alvéoles empêche l'atélectasie, y compris dans ces zones non dépendantes. Mais est-ce que cette pression négative pourrait être délétère à long terme avec des effets associés à l'atélectrauma ? Il a été montré qu'il n'y avait pas plus d'inflammation dans les zones non dépendantes que dans les zones dépendantes durant une VLT de 4h, mais la question demeure ouverte pour des VLT de plus longue durée.

La route est encore longue vers la prévention du développement de la dysplasie bronchopulmonaire, mais une chose est certaine, il est permis plus que jamais d'espérer que la VLT constitue une clef importante chez les nouveau-nés nés extrêmement prématurément.

RÉFÉRENCES

- Abman, S. H., E. Bancalari and A. Jobe (2017). "The Evolution of Bronchopulmonary Dysplasia after 50 Years." *Am J Respir Crit Care Med* **195**(4): 421-424.
- Abman, S. H., J. M. Collaco, E. G. Shepherd, M. Keszler, M. Cuevas-Guaman, S. E. Welty, W. E. Truog, S. A. McGrath-Morrow, P. E. Moore, L. M. Rhein, H. Kirpalani, H. Zhang, L. L. Gratny, S. K. Lynch, J. Curtiss, B. S. Stonestreet, R. L. McKinney, K. C. Dysart, J. Gien, C. D. Baker, P. K. Donohue, E. Austin, C. Fike and L. D. Nelin (2017). "Interdisciplinary Care of Children with Severe Bronchopulmonary Dysplasia." *J Pediatr* **181**: 12-28.e11.
- Abubakar, K. M. and M. Keszler (2001). "Patient-ventilator interactions in new modes of patient-triggered ventilation." *Pediatr Pulmonol* **32**(1): 71-75.
- Adler, A., R. Amyot, R. Guardo, J. H. Bates and Y. Berthiaume (1997). "Monitoring changes in lung air and liquid volumes with electrical impedance tomography." *J Appl Physiol* (1985) **83**(5): 1762-1767.
- Al-Adnani, M. and A. Marnerides (2017). "Complete Bilateral Agenesis of the Diaphragm." *Pediatr Dev Pathol* **20**(1): 66-71.
- Albertine, K. H. (2012). "Brain injury in chronically ventilated preterm neonates: collateral damage related to ventilation strategy." *Clinics in perinatology* **39**(3): 727-740.
- Albertine, K. H. (2013). "Progress in understanding the pathogenesis of BPD using the baboon and sheep models." *Seminars in perinatology* **37**(2): 60-68.
- Albertine, K. H. (2015). "Utility of large-animal models of BPD: chronically ventilated preterm lambs." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **308**(10): L983-11001.
- Aldana-Aguirre, J. C., M. Pinto, R. M. Featherstone and M. Kumar (2017). "Less invasive surfactant administration versus intubation for surfactant delivery in preterm infants with respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **102**(1): F17-f23.

Ambalavanan, N. and R. E. Morty (2016). "Searching for better animal models of BPD: a perspective." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **311**(5): L924-1927.

Anderson, P. J. and L. W. Doyle (2006). "Neurodevelopmental outcome of bronchopulmonary dysplasia." *Semin Perinatol* **30**(4): 227-232.

Aronson, K. and K. Rajwani (2017). "The acute respiratory distress syndrome: a clinical review." *Journal of Emergency and Critical Care Medicine* **1**(9).

Askie, L. M., B. A. Darlow, N. Finer, B. Schmidt, B. Stenson, W. Tarnow-Mordi, P. G. Davis, W. A. Carlo, P. Brocklehurst, L. C. Davies, A. Das, W. Rich, M. G. Gantz, R. S. Roberts, R. K. Whyte, L. Costantini, C. Poets, E. Asztalos, M. Battin, H. L. Halliday, N. Marlow, W. Tin, A. King, E. Juszczak, C. J. Morley, L. W. Doyle, V. Gebski, K. E. Hunter and R. J. Simes (2018). "Association Between Oxygen Saturation Targeting and Death or Disability in Extremely Preterm Infants in the Neonatal Oxygenation Prospective Meta-analysis Collaboration." *Jama* **319**(21): 2190-2201.

Aslam, M., R. Baveja, O. D. Liang, A. Fernandez-Gonzalez, C. Lee, S. A. Mitsialis and S. Kourembanas (2009). "Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease." *Am J Respir Crit Care Med* **180**(11): 1122-1130.

Augustine, S., W. Cheng, M. T. Avey, M. L. Chan, S. M. C. Lingappa, B. Hutton and B. Thébaud (2020). "Are all stem cells equal? Systematic review, evidence map, and meta-analyses of preclinical stem cell-based therapies for bronchopulmonary dysplasia." *Stem cells translational medicine* **9**(2): 158-168.

Avoine, O., D. Bosse, B. Beaudry, A. Beaulieu, R. Albadine, J. P. Praud, R. Robert, P. Micheau and H. Walti (2011). "Total liquid ventilation efficacy in an ovine model of severe meconium aspiration syndrome." *Crit Care Med* **39**(5): 1097-1103.

Bagnoli, P., S. Tredici, R. Seetharamaiah, D. O. Brant, L. A. Hewell, K. Johnson, J. L. Bull, M. L. Costantino and R. B. Hirschl (2007). "Effect of repeated induced airway collapse during total liquid ventilation." *Asaio j* **53**(5): 549-555.

Bancalari, E., N. Claure and I. R. Sosenko (2003). "Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition." *Semin Neonatol* **8**(1): 63-71.

Banker, A. S., W. R. Freeman, J. F. Vander, M. Flores-Aguilar and D. Munguia (1996). "Use of perflubron as a new temporary vitreous substitute and manipulation agent for vitreoretinal surgery. Wills Eye Hospital Perflubron Study Group." *Retina* **16**(4): 285-291.

Baraldi, E. and M. Filippone (2007). "Chronic lung disease after premature birth." *N Engl J Med* **357**(19): 1946-1955.

Bassler, D., R. Plavka, E. S. Shinwell, M. Hallman, P. H. Jarreau, V. Carnielli, J. N. Van den Anker, C. Meisner, C. Engel, M. Schwab, H. L. Halliday and C. F. Poets (2015). "Early Inhaled Budesonide for the Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia." *N Engl J Med* **373**(16): 1497-1506.

Baud, O., C. Trousson, V. Biran, E. Leroy, D. Mohamed and C. Alberti (2017). "Association Between Early Low-Dose Hydrocortisone Therapy in Extremely Preterm Neonates and Neurodevelopmental Outcomes at 2 Years of Age." *Jama* **317**(13): 1329-1337.

Bhandari, V. (2016). *Bronchopulmonary Dysplasia*, Springer International Publishing.

Bhandari, V., M. J. Bizzarro, A. Shetty, X. Zhong, G. P. Page, H. Zhang, L. R. Ment and J. R. Gruen (2006). "Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins." *Pediatrics* **117**(6): 1901-1906.

Bhatia, R., P. G. Davis and D. G. Tingay (2017). "Regional Volume Characteristics of the Preterm Infant Receiving First Intention Continuous Positive Airway Pressure." *J Pediatr* **187**: 80-88.e82.

Borges, J. B., F. Suarez-Sipmann, S. H. Bohm, G. Tusman, A. Melo, E. Maripuu, M. Sandström, M. Park, E. L. Costa, G. Hedenstierna and M. Amato (2012). "Regional lung perfusion estimated by electrical impedance tomography in a piglet model of lung collapse." *J Appl Physiol* (1985) **112**(1): 225-236.

Bose, C., L. J. Van Marter, M. Laughon, T. M. O'Shea, E. N. Allred, P. Karna, R. A. Ehrenkranz, K. Boggess and A. Leviton (2009). "Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation." *Pediatrics* **124**(3): e450-458.

Bui, D. S., C. J. Lodge, J. A. Burgess, A. J. Lowe, J. Perret, M. Q. Bui, G. Bowatte, L. Gurrin, D. P. Johns, B. R. Thompson, G. S. Hamilton, P. A. Frith, A. L. James, P. S. Thomas, D. Jarvis, C. Svanes, M. Russell, S. C. Morrison, I. Feather, K. J. Allen, R. Wood-Baker, J. Hopper, G. G. Giles, M. J. Abramson, E. H. Walters, M. C. Matheson and S. C. Dharmage (2018). "Childhood predictors of lung function trajectories and future COPD risk: a prospective cohort study from the first to the sixth decade of life." *Lancet Respir Med* **6**(7): 535-544.

Cabrales, P., B. Y. S. VÁZquez, A. C. Negrete and M. Intaglietta (2007). "Perfluorocarbons as gas transporters for O₂, NO, CO and volatile anesthetics." *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine* **9**(4): 294-303.

Calderwood, H. W., B. C. Ruiz, M. K. Tham, J. H. Modell, S. A. Saga and C. I. Hood (1975). "Residual levels and biochemical changes after ventilation with perfluorinated liquid." *J Appl Physiol* **39**(4): 603-607.

Cantin, D., D. Djeddi, V. Carriere, N. Samson, S. Nault, W. L. Jia, J. Beck and J. P. Praud (2016). "Inhibitory Effect of Nasal Intermittent Positive Pressure Ventilation on Gastroesophageal Reflux." *PLoS One* **11**(1): e0146742.

Carlo, W. A., A. R. Stark, L. L. Wright, J. E. Tyson, L. A. Papile, S. Shankaran, E. F. Donovan, W. Oh, C. R. Bauer, S. Saha, W. K. Poole and B. Stoll (2002). "Minimal ventilation to prevent bronchopulmonary dysplasia in extremely-low-birth-weight infants." *J Pediatr* **141**(3): 370-374.

Chandrasekharan, P. K., M. Rawat, R. Madappa, D. H. Rothstein and S. Lakshminrusimha (2017). "Congenital Diaphragmatic hernia - a review." *Maternal health, neonatology and perinatology* **3**: 6-6.

- Chang, Y. S., S. Y. Ahn, H. S. Yoo, S. I. Sung, S. J. Choi, W. I. Oh and W. S. Park (2014). "Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial." *J Pediatr* **164**(5): 966-972.e966.
- Chappell, S. E., M. R. Wolfson and T. H. Shaffer (2001). "A comparison of surfactant delivery with conventional mechanical ventilation and partial liquid ventilation in meconium aspiration injury." *Respir Med* **95**(7): 612-617.
- Cheifetz, I. M. (2014). "Cardiorespiratory interactions: the relationship between mechanical ventilation and hemodynamics." *Respir Care* **59**(12): 1937-1945.
- Chen, L., H.-F. Xia, Y. Shang and S.-L. Yao (2018). "Molecular Mechanisms of Ventilator-Induced Lung Injury." *Chinese medical journal* **131**(10): 1225-1231.
- Chen, Z. L., Y. L. Song, Z. Y. Hu, S. Zhang and Y. Z. Chen (2015). "An estimation of mechanical stress on alveolar walls during repetitive alveolar reopening and closure." *J Appl Physiol (1985)* **119**(3): 190-201.
- Choi, Y. J., M. C. Kim, Y. J. Lim, S. Z. Yoon, S. M. Yoon and H. R. Yoon (2014). "Propofol infusion associated metabolic acidosis in patients undergoing neurosurgical anesthesia: a retrospective study." *Journal of Korean Neurosurgical Society* **56**(2): 135-140.
- Chono, S., T. Tanino, T. Seki and K. Morimoto (2006). "Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes." *J Drug Target* **14**(8): 557-566.
- Chowdhury, O., G. F. Rafferty, S. Lee, S. Hannam, A. D. Milner and A. Greenough (2012). "Volume-targeted ventilation in infants born at or near term." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **97**(4): F264-266.
- Chroneos, Z. C., Z. Sever-Chroneos and V. L. Shepherd (2010). "Pulmonary surfactant: an immunological perspective." *Cell Physiol Biochem* **25**(1): 13-26.
- Ciuffini, F., C. F. Robertson and D. G. Tingay (2018). "How best to capture the respiratory consequences of prematurity?" *Eur Respir Rev* **27**(147).

Clark, J. C., S. E. Wert, C. J. Bachurski, M. T. Stahlman, B. R. Stripp, T. E. Weaver and J. A. Whitsett (1995). "Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7794-7798.

Clark, L. C. and F. Gollan (1966). "Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure." *Science* **152**.

Collins, J. J. P., D. Tibboel, I. M. de Kleer, I. K. M. Reiss and R. J. Rottier (2017). "The Future of Bronchopulmonary Dysplasia: Emerging Pathophysiological Concepts and Potential New Avenues of Treatment." *Front Med (Lausanne)* **4**: 61.

Cools, F., L. M. Askie, M. Offringa, J. M. Asselin, S. A. Calvert, S. E. Courtney, C. Dani, D. J. Durand, D. R. Gerstmann, D. J. Henderson-Smart, N. Marlow, J. L. Peacock, J. J. Pillow, R. F. Soll, U. H. Thome, P. Truffert, M. D. Schreiber, P. Van Reempts, V. Vendettuoli and G. Vento (2010). "Elective high-frequency oscillatory versus conventional ventilation in preterm infants: a systematic review and meta-analysis of individual patients' data." *Lancet* **375**(9731): 2082-2091.

Costantino, M. L., P. Bagnoli, G. Dini, G. B. Fiore, M. Soncini, C. Corno, F. Acocella and R. Colombi (2004). "A numerical and experimental study of compliance and collapsibility of preterm lamb tracheae." *J Biomech* **37**(12): 1837-1847.

Costantino, M. L. and G. B. Fiore (2001). "A model of neonatal tidal liquid ventilation mechanics." *Med Eng Phys* **23**(7): 457-471.

Cotten, C. M., W. Oh, S. McDonald, W. Carlo, A. A. Fanaroff, S. Duara, B. Stoll, A. Laptook, K. Poole, L. L. Wright and R. N. Goldberg (2005). "Prolonged hospital stay for extremely premature infants: risk factors, center differences, and the impact of mortality on selecting a best-performing center." *J Perinatol* **25**(10): 650-655.

Cotten, M. and R. H. Clark (2001). "The science of neonatal high-frequency ventilation." *Respir Care Clin N Am* **7**(4): 611-631.

Courtice, F. C. and P. J. Phipps (1946). "The absorption of fluids from the lungs." *J Physiol* **105**: 186-190.

Cullen, A. B., C. A. Cox, S. J. Hipp, M. R. Wolfson and T. H. Shaffer (1999). "Intra-tracheal delivery strategy of gentamicin with partial liquid ventilation." *Respir Med* **93**(11): 770-778.

Curtis, S. E., B. P. Fuhrman, D. F. Howland, M. DeFrancisis and E. K. Motoyama (1991). "Cardiac output during liquid (perfluorocarbon) breathing in newborn piglets." *Crit Care Med* **19**(2): 225-230.

Dargaville, P. A., A. Aiyappan, A. G. De Paoli, C. A. Kuschel, C. O. Kamlin, J. B. Carlin and P. G. Davis (2013). "Minimally-invasive surfactant therapy in preterm infants on continuous positive airway pressure." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **98**(2): F122-126.

Davidson, L. M. and S. K. Berkelhamer (2017). "Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes." *Journal of clinical medicine* **6**(1): 4.

Davidson, L. M. and S. K. Berkelhamer (2017). "Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes." *J Clin Med* **6**(1).

Davidson, S., A. Schrayner, E. Wielunsky, R. Krikler, P. Lilos and S. H. Reisner (1990). "Energy intake, growth, and development in ventilated very-low-birth-weight infants with and without bronchopulmonary dysplasia." *Am J Dis Child* **144**(5): 553-559.

De Paoli, A. G., C. Morley and P. G. Davis (2003). "Nasal CPAP for neonates: what do we know in 2003?" *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* **88**(3): F168-F172.

Degraeuwe, P. L., G. D. Vos, G. G. Geskens, J. M. Geilen and C. E. Blanco (2000). "Effect of perfluorochemical liquid ventilation on cardiac output and blood pressure variability in neonatal piglets with respiratory insufficiency." *Pediatr Pulmonol* **30**(2): 114-124.

Diamond, M., H. L. Peniston Feliciano, D. Sanghavi and S. Mahapatra (2020). Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.

Dickson, E. W., S. O. Heard, T. E. Tarara, J. G. Weers, A. B. Brueggemann and G. V. Doern (2002). "Liquid ventilation with perflubron in the treatment of rats with pneumococcal pneumonia." *Crit Care Med* **30**(2): 393-395.

Djeddi, D., N. Samson, N. Boudaa and J. P. Praud (2012). "Newborn lamb as a new model for studying gastroesophageal reflux." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **55**(6): 745-746.

Doctor, A., J. C. Ibla, B. M. Grenier, D. Zurakowski, M. L. Ferretti, J. E. Thompson, C. W. Lillehei and J. H. Arnold (1998). "Pulmonary blood flow distribution during partial liquid ventilation." *Journal of Applied Physiology* **84**(5): 1540-1550.

Doyle, L. W., P. G. Davis, C. J. Morley, A. McPhee and J. B. Carlin (2007). "Outcome at 2 years of age of infants from the DART study: a multicenter, international, randomized, controlled trial of low-dose dexamethasone." *Pediatrics* **119**(4): 716-721.

Dreyfuss, D. and G. Saumon (1998). "Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(1): 294-323.

Ehrenkranz, R. A., A. Das, L. A. Wrage, B. B. Poindexter, R. D. Higgins, B. J. Stoll and W. Oh (2011). "Early nutrition mediates the influence of severity of illness on extremely LBW infants." *Pediatr Res* **69**(6): 522-529.

Eichenwald, E. C. (2016). "Apnea of Prematurity." *Pediatrics* **137**(1).

Eriksson, L., B. Haglund, V. Odling, M. Altman, U. Ewald and H. Kieler (2015). "Perinatal conditions related to growth restriction and inflammation are associated with an increased risk of bronchopulmonary dysplasia." *Acta Paediatr* **104**(3): 259-263.

Eriksson, L., B. Haglund, V. Odland, M. Altman and H. Kieler (2014). "Prenatal inflammatory risk factors for development of bronchopulmonary dysplasia." *Pediatr Pulmonol* **49**(7): 665-672.

Eutamene, H., V. Theodorou, F. Schmidlin, V. Tondereau, R. Garcia-Villar, C. Salvador-Cartier, M. Chovet, C. Bertrand and L. Bueno (2005). "LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK." *Eur Respir J* **25**(5): 789-796.

Farrell, O., E. J. Perkins, D. Black, M. Miedema, J. D. Paul, P. M. Pereira-Fantini and D. G. Tingay (2018). "Volume guaranteed? Accuracy of a volume-targeted ventilation mode in infants." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **103**(2): F120-f125.

Ferguson, K. N., C. T. Roberts, B. J. Manley and P. G. Davis (2017). "Interventions to Improve Rates of Successful Extubation in Preterm Infants: A Systematic Review and Meta-analysis." *JAMA Pediatr* **171**(2): 165-174.

Freeman, B. A. and J. D. Crapo (1982). "Biology of disease: free radicals and tissue injury." *Lab Invest* **47**(5): 412-426.

Fujino, Y., M. Kirmse, D. Hess and R. M. Kacmarek (1999). "The effect of mode, inspiratory time, and positive end-expiratory pressure on partial liquid ventilation." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(4 Pt 1): 1087-1095.

Galvin, I. M., A. Steel, R. Pinto, N. D. Ferguson and M. W. Davies (2013). "Partial liquid ventilation for preventing death and morbidity in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome." *Cochrane Database Syst Rev*(7): Cd003707.

Ganter, M. T., J. Roux, B. Miyazawa, M. Howard, J. A. Frank, G. Su, D. Sheppard, S. M. Violette, P. H. Weinreb, G. S. Horan, M. A. Matthay and J.-F. Pittet (2008). "Interleukin-1 β Causes Acute Lung Injury via α v β 5 and α v β 6 Integrin-Dependent Mechanisms." *Circulation research* **102**(7): 804-812.

Gauger, P. G., M. C. Overbeck, S. D. Chambers, C. I. Cailipan and R. B. Hirschl (1998). "Partial liquid ventilation improves gas exchange and increases EELV in acute lung injury." *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **84**(5): 1566-1572.

Giuliani, E., S. Magnoni, M. Fei, A. Addis, R. Zanasi, N. Stocchetti and A. Barbieri (2016). "A Novel Cooling Device for Targeted Brain Temperature Control and Therapeutic Hypothermia: Feasibility Study in an Animal Model." *Neurocrit Care*.

Glasser, S. W., M. S. Burhans, T. R. Korfhagen, C. L. Na, P. D. Sly, G. F. Ross, M. Ikegami and J. A. Whitsett (2001). "Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(11): 6366-6371.

Greenspan, J. S., M. R. Wolfson, S. D. Rubenstein and T. H. Shaffer (1990). "Liquid ventilation of human preterm neonates." *J Pediatr* **117**(1 Pt 1): 106-111.

Groenman, F., M. Rutter, I. Caniggia, D. Tibboel and M. Post (2007). "Hypoxia-inducible factors in the first trimester human lung." *J Histochem Cytochem* **55**(4): 355-363.

Guimaraes, H., M. B. Guedes, G. Rocha, T. Tome and A. Albino-Teixeira (2012). "Vitamin A in prevention of bronchopulmonary dysplasia." *Curr Pharm Des* **18**(21): 3101-3113.

Haagsman, H. P. (1998). "Interactions of surfactant protein A with pathogens." *Biochim Biophys Acta* **1408**(2-3): 264-277.

Hagberg, H., D. Peebles and C. Mallard (2002). "Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults." *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **8**(1): 30-38.

Harris, R. S., D.-B. Willey-Courand, C. A. Head, G. G. Galletti, D. M. Call and J. G. Venegas (2002). "Regional VA, Q, and VA/Q during PLV: effects of nitroprusside and inhaled nitric oxide." *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **92**(1): 297-312.

Hartling, L., Y. Liang and T. Lacaze-Masmonteil (2012). "Chorioamnionitis as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **97**(1): F8-f17.

Herber-Jonat, S., A. Vuckovic, R. Mittal, A. Hilgendorff, J. C. Jani and A. W. Flemmer (2014). "Intrapulmonary instillation of perflurooctylbromide improves lung growth,

alveolarization, and lung mechanics in a fetal rabbit model of diaphragmatic hernia." *Pediatr Crit Care Med* **15**(9): e379-388.

Hillman, N. H., S. G. Kallapur, J. J. Pillow, T. J. Moss, G. R. Polglase, I. Nitsos and A. H. Jobe (2010). "Airway injury from initiating ventilation in preterm sheep." *Pediatr Res* **67**(1): 60-65.

Hillman, N. H., T. J. Moss, S. G. Kallapur, C. Bachurski, J. J. Pillow, G. R. Polglase, I. Nitsos, B. W. Kramer and A. H. Jobe (2007). "Brief, large tidal volume ventilation initiates lung injury and a systemic response in fetal sheep." *Am J Respir Crit Care Med* **176**(6): 575-581.

Hirata, K., M. Nishihara, T. Kimura, J. Shiraishi, S. Hirano, H. Kitajima and M. Fujimura (2017). "Longitudinal impairment of lung function in school-age children with extremely low birth weights." *Pediatr Pulmonol* **52**(6): 779-786.

Hirschl, R. B., M. C. Overbeck, A. Parent, R. Hernandez, S. Schwartz, A. Dosanjh, K. Johnson and R. H. Bartlett (1994). "Liquid ventilation provides uniform distribution of perfluorocarbon in the setting of respiratory failure." *Surgery* **116**(2): 159-167; discussion 167-158.

Hirschl, R. B., A. Parent, R. Tooley, M. McCracken, K. Johnson, T. H. Shaffer, M. R. Wolfson and R. H. Bartlett (1995). "Liquid ventilation improves pulmonary function, gas exchange, and lung injury in a model of respiratory failure." *Ann Surg* **221**(1): 79-88.

Hirschl, R. B., T. Pranikoff, C. Wise, M. C. Overbeck, P. Gauger, R. J. Schreiner, R. Dechert and R. H. Bartlett (1996). "Initial experience with partial liquid ventilation in adult patients with the acute respiratory distress syndrome." *Jama* **275**(5): 383-389.

Hood, C. I. and J. H. Modell (2000). "A morphologic study of long-term retention of fluorocarbon after liquid ventilation." *Chest* **118**(5): 1436-1440.

Hotchkiss, J. R., Jr., L. Blanch, G. Murias, A. B. Adams, D. A. Olson, O. D. Wangenstein, P. H. Leo and J. J. Marini (2000). "Effects of decreased respiratory frequency on ventilator-induced lung injury." *Am J Respir Crit Care Med* **161**(2 Pt 1): 463-468.

Hutin, A., F. Lidouren, M. Kohlhauer, L. Lotteau, A. Seemann, N. Mongardon, B. Renaud, D. Isabey, P. Carli, B. Vivien, J. D. Ricard, T. Hauet, R. E. Kerber, A. Berdeaux, B. Ghaleh and R. Tissier (2015). "Total liquid ventilation offers ultra-fast and whole-body cooling in large animals in physiological conditions and during cardiac arrest." *Resuscitation* **93**: 69-73.

Huusko, J. M., M. K. Karjalainen, M. Mahlman, R. Haataja, M. A. Kari, S. Andersson, G. Toldi, O. Tammela, M. Rämetsä, P. M. Lavoie, M. Hallman and B. P. D. S. G. Gen (2014). "A study of genes encoding cytokines (IL6, IL10, TNF), cytokine receptors (IL6R, IL6ST), and glucocorticoid receptor (NR3C1) and susceptibility to bronchopulmonary dysplasia." *BMC medical genetics* **15**: 120-120.

Isayama, T., C. Chai-Adisaksopha and S. D. McDonald (2015). "Noninvasive Ventilation With vs Without Early Surfactant to Prevent Chronic Lung Disease in Preterm Infants: A Systematic Review and Meta-analysis." *JAMA Pediatr* **169**(8): 731-739.

Jackson, J. C., T. A. Standaert, W. E. Truog and W. A. Hodson (1994). "Full-tidal liquid ventilation with perfluorocarbon for prevention of lung injury in newborn non-human primates." *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **22**(4): 1121-1132.

Jensen, E. A., S. B. DeMauro, M. Kornhauser, Z. H. Aghai, J. S. Greenspan and K. C. Dysart (2015). "Effects of Multiple Ventilation Courses and Duration of Mechanical Ventilation on Respiratory Outcomes in Extremely Low-Birth-Weight Infants." *JAMA Pediatr* **169**(11): 1011-1017.

Jensen, E. A. and B. Schmidt (2014). "Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **100**(3): 145-157.

Jiang, L., H. Feng, X. Chen, K. Liang and C. Ni (2016). "Low Tidal Volume Reduces Lung Inflammation Induced by Liquid Ventilation in Piglets With Severe Lung Injury." *Artif Organs*.

Jiang, L., H. Feng, X. Chen, K. Liang and C. Ni (2017). "Low Tidal Volume Reduces Lung Inflammation Induced by Liquid Ventilation in Piglets With Severe Lung Injury." *Artif Organs* **41**(5): 440-445.

Jobe, A. H. (2015). "Animal Models, Learning Lessons to Prevent and Treat Neonatal Chronic Lung Disease." *Front Med (Lausanne)* **2**: 49.

Jobe, A. H. (2016). "Mechanisms of Lung Injury and Bronchopulmonary Dysplasia." *Am J Perinatol* **33**(11): 1076-1078.

Jobe, A. H. and E. Bancalari (2001). "Bronchopulmonary dysplasia." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(7): 1723-1729.

Jobe, A. H., N. Hillman, G. Polglase, B. W. Kramer, S. Kallapur and J. Pillow (2008). "Injury and inflammation from resuscitation of the preterm infant." *Neonatology* **94**(3): 190-196.

Jobe, A. J. (1999). "The new BPD: an arrest of lung development." *Pediatr Res* **46**(6): 641-643.

Jolli, A. (2020). ÉTUDE EXPÉRIMENTALE ET NUMÉRIQUE COMPORTEMENT DYNAMIQUE DU COLLAPSUS DANS LE CADRE DE LA VENTILATION LIQUIDIENNE TOTALE. Maitrise Université de Sherbrooke

Jonker, S. S., L. Zhang, S. Louey, G. D. Giraud, K. L. Thornburg and J. J. Faber (2007). "Myocyte enlargement, differentiation, and proliferation kinetics in the fetal sheep heart." *J Appl Physiol (1985)* **102**(3): 1130-1142.

Kacmarek, R. M., H. P. Wiedemann, P. T. Lavin, M. K. Wedel, A. S. Tutuncu and A. S. Slutsky (2006). "Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome." *Am J Respir Crit Care Med* **173**.

Katira, B. H. (2019). "Ventilator-Induced Lung Injury: Classic and Novel Concepts." *Respir Care* **64**(6): 629-637.

Kennedy, K. A., C. M. Cotten, K. L. Watterberg and W. A. Carlo (2016). "Prevention and management of bronchopulmonary dysplasia: Lessons learned from the neonatal research network." *Semin Perinatol* **40**(6): 348-355.

Keszler, M. (2017). "Mechanical ventilation strategies." *Semin Fetal Neonatal Med* **22**(4): 267-274.

Keszler, M., S. Nassabeh-Montazami and K. Abubakar (2009). "Evolution of tidal volume requirement during the first 3 weeks of life in infants <800 g ventilated with Volume Guarantee." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **94**(4): F279-282.

Kiciman, N. M., B. Andréasson, G. Bernstein, F. L. Mannino, W. Rich, C. Henderson and G. P. Heldt (1998). "Thoracoabdominal motion in newborns during ventilation delivered by endotracheal tube or nasal prongs." *Pediatr Pulmonol* **25**(3): 175-181.

Kimmoun, A., E. Novy, T. Auchet, N. Ducrocq and B. Levy (2015). "Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside." *Critical care (London, England)* **19**(1): 175-175.

Kishore, U., T. J. Greenhough, P. Waters, A. K. Shrive, R. Ghai, M. F. Kamran, A. L. Bernal, K. B. M. Reid, T. Madan and T. Chakraborty (2006). "Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors." *Molecular Immunology* **43**(9): 1293-1315.

Klingenberg, C., K. I. Wheeler, N. McCallion, C. J. Morley and P. G. Davis (2017). "Volume-targeted versus pressure-limited ventilation in neonates." *Cochrane Database Syst Rev* **10**(10): Cd003666.

Kloot, T. E., L. Blanch, A. Melynné Youngblood, C. Weinert, A. B. Adams, J. J. Marini, R. S. Shapiro and A. Nahum (2000). "Recruitment maneuvers in three experimental models of acute lung injury. Effect on lung volume and gas exchange." *Am J Respir Crit Care Med* **161**(5): 1485-1494.

Kneyber, M. C. (2018). "Ventilator-induced lung injury: does it occur in children?" *Minerva Anesthesiol* **84**(5): 626-631.

Koen, P. A., M. R. Wolfson and T. H. Shaffer (1988). "Fluorocarbon ventilation: maximal expiratory flows and CO₂ elimination." *Pediatr Res* **24**(3): 291-296.

Kohlhauer, M., E. Boissady, F. Lidouren, L. de Rochefort, M. Nadeau, J. Rambaud, A. Hutin, R.-M. Dubuisson, G. Guillot, P. Pey, P. Bruneval, E. Fortin-Pellerin, M. Sage, H. Walti, A. Cariou, J.-D. Ricard, A. Berdeaux, N. Mongardon, B. Ghaleh, P. Micheau and R. Tissier (2019). "A new paradigm for lung-conservative total liquid ventilation." *EBioMedicine*.

Kohlhauer, M., F. Lidouren, I. Remy-Jouet, N. Mongardon, C. Adam, P. Bruneval, H. Hocini, Y. Levy, F. Blengio, P. Carli, B. Vivien, J. D. Ricard, P. Micheau, H. Walti, M. Nadeau, R. Robert, V. Richard, P. Mulder, D. Maresca, C. Demene, M. Pernot, M. Tanter, B. Ghaleh, A. Berdeaux and R. Tissier (2015). "Hypothermic Total Liquid Ventilation Is Highly Protective Through Cerebral Hemodynamic Preservation and Sepsis-Like Mitigation After Asphyxial Cardiac Arrest." *Crit Care Med* **43**(10): e420-430.

Kurath-Koller, S., B. Resch, R. Kraschl, C. Windpassinger and E. Eber (2015). "Surfactant Protein B Deficiency Caused by Homozygous C248X Mutation-A Case Report and Review of the Literature." *AJP reports* **5**(1): e53-e59.

Lachmann, B., B. Robertson and J. Vogel (1980). "In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome." *Acta Anaesthesiol Scand* **24**(3): 231-236.

Lagatta, J. M., E. B. Hysinger, I. Zaniletti, E. M. Wymore, S. Vyas-Read, S. Yallapragada, L. D. Nelin, W. E. Truog, M. A. Padula, N. F. M. Porta, R. C. Savani, K. P. Potoka, S. M. Kawut, R. DiGeronimo, G. Natarajan, H. Zhang, T. R. Grover, W. A. Engle, K. Murthy and B. P. D. F. G. Children's Hospital Neonatal Consortium Severe (2018). "The Impact of Pulmonary Hypertension in Preterm Infants with Severe Bronchopulmonary Dysplasia through 1 Year." *The Journal of pediatrics* **203**: 218-224.e213.

Lakshminrusimha, S. (2012). "The pulmonary circulation in neonatal respiratory failure." *Clinics in perinatology* **39**(3): 655-683.

Lal, C. V. and N. Ambalavanan (2015). "Biomarkers, Early Diagnosis, and Clinical Predictors of Bronchopulmonary Dysplasia." *Clin Perinatol* **42**(4): 739-754.

Landry, J. S., T. Chan, L. Lands and D. Menzies (2011). "Long-term impact of bronchopulmonary dysplasia on pulmonary function." *Canadian Respiratory Journal : Journal of the Canadian Thoracic Society* **18**(5): 265-270.

Lavoie, P. M., C. Pham and K. L. Jang (2008). "Heritability of bronchopulmonary dysplasia, defined according to the consensus statement of the national institutes of health." *Pediatrics* **122**(3): 479-485.

Leach, C. L., J. S. Greenspan, S. D. Rubenstein, T. H. Shaffer, M. R. Wolfson, J. C. Jackson, R. DeLemos and B. P. Fuhrman (1996). "Partial liquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome. The LiquiVent Study Group." *N Engl J Med* **335**(11): 761-767.

Leach, C. L., B. Holm, F. C. Morin, 3rd, B. P. Fuhrman, M. C. Papo, D. Steinhorn and L. J. Hernan (1995). "Partial liquid ventilation in premature lambs with respiratory distress syndrome: efficacy and compatibility with exogenous surfactant." *J Pediatr* **126**(3): 412-420.

Lee, J. W. and J. M. Davis (2011). "Future applications of antioxidants in premature infants." *Curr Opin Pediatr* **23**(2): 161-166.

Lemyre, B., P. G. Davis, A. G. De Paoli and H. Kirpalani (2017). "Nasal intermittent positive pressure ventilation (NIPPV) versus nasal continuous positive airway pressure (NCPAP) for preterm neonates after extubation." *Cochrane Database Syst Rev* **2**: Cd003212.

Lewis, D. A., D. Colton, K. Johnson and R. B. Hirschl (2001). "Prevention of ventilator-induced lung injury with partial liquid ventilation." *J Pediatr Surg* **36**(9): 1333-1336.

Liszewski, M. C. and E. Y. Lee (2018). "Neonatal Lung Disorders: Pattern Recognition Approach to Diagnosis." *AJR Am J Roentgenol* **210**(5): 964-975.

Lizio, R., T. Klenner, G. Borchard, P. Romeis, A. W. Sarlikiotis, T. Reissmann and C. M. Lehr (2000). "Systemic delivery of the GnRH antagonist cetrorelix by intratracheal instillation in anesthetized rats." *Eur J Pharm Sci* **9**(3): 253-258.

Lobo, V., A. Patil, A. Phatak and N. Chandra (2010). "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health." *Pharmacognosy reviews* **4**(8): 118-126.

Logan, J. W. (2018). "First, Do No Harm. Consequences of Permissive Hypercapnia in the Neonate." *Respiratory Care* **63**(8): 1070.

Logan, J. W., O. Dammann, E. N. Allred, C. Dammann, K. Beam, R. M. Joseph, T. M. O'Shea, A. Leviton and K. C. K. Kuban (2017). "Early postnatal illness severity scores predict neurodevelopmental impairments at 10 years of age in children born extremely preterm." *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* **37**(5): 606-614.

Lombardi, E. and V. Fainardi (2018). "Lung function in a cohort of 5-year-old children born very preterm." **53**(12): 1633-1639.

Lowe, C., R. F. Tuma, E. M. Sivieri and T. H. Shaffer (1979). "Liquid ventilation: cardiovascular adjustments with secondary hyperlactatemia and acidosis." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **47**(5): 1051-1057.

Lowe, C. A. and T. H. Shaffer (1986). "Pulmonary vascular resistance in the fluorocarbon-filled lung." *J Appl Physiol (1985)* **60**(1): 154-159.

Luecke, T., J. P. Meinhardt, P. Herrmann, S. Klemm, A. Weiss, G. Weisser, R. B. Hirschl and M. Quintel (2003). "End-expiratory lung volumes and density distribution patterns during partial liquid ventilation in healthy and oleic acid-injured sheep: a computed tomography study." *Crit Care Med* **31**(8): 2190-2197.

Luecke, T. and P. Pelosi (2005). "Clinical review: Positive end-expiratory pressure and cardiac output." *Critical care (London, England)* **9**(6): 607-621.

MacLean, J. E., K. DeHaan, D. Fuhr, S. Hariharan, B. Kamstra, L. Henderson, I. Adatia, C. Majaesic, A. T. Lovering, R. B. Thompson, D. Nicholas, B. Thebaud and M. K. Stickland (2016). "Altered breathing mechanics and ventilatory response during exercise in children born extremely preterm." *Thorax* **71**(11): 1012-1019.

Mailaparambil, B., M. Krueger, U. Heizmann, K. Schlegel, J. Heinze and A. Heinzmann (2010). "Genetic and epidemiological risk factors in the development of bronchopulmonary dysplasia." *Dis Markers* **29**(1): 1-9.

Major, D., M. Cadenas, R. Cloutier, S. Leclerc, L. Fournier, T. H. Shaffer and M. R. Wolfson (1997). "Morphometrics of normal and hypoplastic lungs in preterm lambs with gas and partial liquid ventilation." *Pediatr Surg Int* **12**(2/3): 121-125.

Mallard, C., A. K. Welin, D. Peebles, H. Hagberg and I. Kjellmer (2003). "White matter injury following systemic endotoxemia or asphyxia in the fetal sheep." *Neurochem Res* **28**(2): 215-223.

Manja, V., O. D. Saugstad and S. Lakshminrusimha (2017). "Oxygen Saturation Targets in Preterm Infants and Outcomes at 18-24 Months: A Systematic Review." *Pediatrics* **139**(1).

Martin, T. R. and G. Matute-Bello (2011). "Experimental Models and Emerging Hypotheses for Acute Lung Injury." *Critical care clinics* **27**(3): 735-752.

Meeusen, E. N., K. J. Snibson, S. J. Hirst and R. J. Bischof (2009). "Sheep as a model species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases." *Drug Discovery Today: Disease Models* **6**(4): 6.

Miller, E. K., J. Bugna, R. Libster, B. E. Shepherd, P. M. Scalzo, P. L. Acosta, D. Hijano, N. Reynoso, J. P. Batalle, S. Coviello, M. I. Klein, G. Bauer, A. Benitez, S. R. Kleeberger and F. P. Polack (2012). "Human rhinoviruses in severe respiratory disease in very low birth weight infants." *Pediatrics* **129**(1): e60-67.

Miller, T. F., B. Milestone, R. Stern, T. H. Shaffer and M. R. Wolfson (2001). "Effects of perfluorochemical distribution and elimination dynamics on cardiopulmonary function." *J Appl Physiol* **90**.

Moldoveanu, B., P. Otmishi, P. Jani, J. Walker, X. Sarmiento, J. Guardiola, M. Saad and J. Yu (2008). "Inflammatory mechanisms in the lung." *Journal of inflammation research* **2**: 1-11.

Monaco, A., P. Bagnoli, T. Anzani, G. B. Fiore, R. Colombi, R. Fumero, F. Acocella and M. L. Costantino (2006). "TOTAL LIQUID VENTILATION IN PRETERM LAMBS: REPORT OF IN VIVO TESTS OF A VENTILATOR PROTOTYPE." *ASAIO Journal* **52**(4): 491.

Mora Carpio, A. L. and J. I. Mora (2020). Positive End-Expiratory Pressure (PEEP). *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing
StatPearls Publishing LLC.

Morley, C. J., P. G. Davis, L. W. Doyle, L. P. Brion, J. M. Hascoet and J. B. Carlin (2008). "Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants." *N Engl J Med* **358**(7): 700-708.

Morris, K. P., P. N. Cox, C. D. Mazer, H. Frndova, C. McKerlie and R. Wolfe (2000). "Distribution of pulmonary blood flow in the perfluorocarbon-filled lung." *Intensive Care Med* **26**(6): 756-763.

Morrow, L. A., B. D. Wagner, D. A. Ingram, B. B. Poindexter, K. Schibler, C. M. Cotten, J. Dagle, M. K. Sontag, P. M. Mourani and S. H. Abman (2017). "Antenatal Determinants of Bronchopulmonary Dysplasia and Late Respiratory Disease in Preterm Infants." *Am J Respir Crit Care Med* **196**(3): 364-374.

Morty, R. E. (2018). "Recent advances in the pathogenesis of BPD." *Semin Perinatol* **42**(7): 404-412.

Moschino, L., S. Zivanovic, C. Hartley, D. Trevisanuto, E. Baraldi and C. C. Roehr (2020). "Caffeine in preterm infants: where are we in 2020?" *ERJ open research* **6**(1): 00330-02019.

Nadeau, M., P. Micheau, R. Robert, O. Avoine, R. Tissier, P. S. Germim, J. Vandamme, J. P. Praud and H. Walti (2014). "Core body temperature control by total liquid ventilation using a virtual lung temperature sensor." *IEEE Trans Biomed Eng* **61**(12): 2859-2868.

Nickerson, B. G. and L. M. Taussig (1980). "Family history of asthma in infants with bronchopulmonary dysplasia." *Pediatrics* **65**(6): 1140-1144.

Northway, W. H., Jr., R. C. Rosan and D. Y. Porter (1967). "Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia." *N Engl J Med* **276**(7): 357-368.

O'Connell, E. J. (2002). "Efficacy of budesonide in moderate to severe asthma." *Clin Ther* **24**(6): 887-905; discussion 837.

Oczypok, E. A., T. N. Perkins and T. D. Oury (2017). "All the "RAGE" in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses." *Paediatr Respir Rev* **23**: 40-49.

Odenstedt, H., A. Aneman, S. Karason, O. Stenqvist and S. Lundin (2005). "Acute hemodynamic changes during lung recruitment in lavage and endotoxin-induced ALI." *Intensive Care Med* **31**(1): 112-120.

Overfield, D. M., S. H. Bennett, B. W. Goetzman, J. M. Milstein and A. J. Moon-Grady (2001). "Hemodynamic effects of positive end-expiratory pressure during partial liquid ventilation in newborn lambs." *J Pediatr Surg* **36**(9): 1327-1332.

Ozsurekci, Y. and K. Aykac (2016). "Oxidative Stress Related Diseases in Newborns." *Oxid Med Cell Longev* **2016**: 2768365.

Patil, J. S. and S. Sarasija (2012). "Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review." *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society* **29**(1): 44-49.

Perrone, S., S. Negro, M. L. Tataranno and G. Buonocore (2010). "Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns." *J Matern Fetal Neonatal Med* **23 Suppl 3**: 63-65.

Perrone, S., M. L. Tataranno and G. Buonocore (2012). "Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia." *Journal of clinical neonatology* **1**(3): 109-114.

Phaniendra, A., D. B. Jestadi and L. Periyasamy (2015). "Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases." *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* **30**(1): 11-26.

Plosa, E. and S. H. Guttentag (2018). 42 - Lung Development. *Avery's Diseases of the Newborn (Tenth Edition)*. C. A. Gleason and S. E. Juul. Philadelphia, Content Repository Only!: 586-599.e582.

Pohlmann, J. R., D. O. Brant, M. A. Daul, J. L. Reoma, A. C. Kim, K. R. Osterholzer, K. J. Johnson, R. H. Bartlett, K. E. Cook and R. B. Hirschl (2011). "Total Liquid Ventilation Provides Superior Respiratory Support to Conventional Mechanical Ventilation in a Large Animal Model of Severe Respiratory Failure." *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)* **57**(1): 1-8.

Poindexter, B. B. and C. R. Martin (2015). "Impact of Nutrition on Bronchopulmonary Dysplasia." *Clin Perinatol* **42**(4): 797-806.

Polglase, G. R., N. H. Hillman, M. K. Ball, B. W. Kramer, S. G. Kallapur, A. H. Jobe and J. J. Pillow (2009). "Lung and systemic inflammation in preterm lambs on continuous positive airway pressure or conventional ventilation." *Pediatr Res* **65**(1): 67-71.

Powell, S. B. and J. M. Silvestri (2019). "Safety of Intratracheal Administration of Human Umbilical Cord Blood Derived Mesenchymal Stromal Cells in Extremely Low Birth Weight Preterm Infants." *J Pediatr* **210**: 209-213.e202.

Puyo, C. A. and T. E. Dahms (2012). "Innate immunity mediating inflammation secondary to endotracheal intubation." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **138**(9): 854-858.

Quintel, M., R. B. Hirschl, H. Roth, R. Loose and K. van Ackern (1998). "Computer tomographic assessment of perfluorocarbon and gas distribution during partial liquid ventilation for acute respiratory failure." *Am J Respir Crit Care Med* **158**(1): 249-255.

Rambaud, J., F. Lidouren, M. Sage, M. Kohlhauer, M. Nadeau, E. Fortin-Pellerin, P. Micheau, L. Zilberstein, N. Mongardon, J. D. Ricard, M. Terada, P. Bruneval, A. Berdeaux, B. Ghaleh, H. Walti and R. Tissier (2018). "Hypothermic total liquid ventilation after experimental aspiration-associated acute respiratory distress syndrome." *Ann Intensive Care* **8**(1): 57.

Ratner, V., S. V. Kishkurno, S. K. Slinko, S. A. Sosunov, A. A. Sosunov, R. A. Polin and V. S. Ten (2007). "The contribution of intermittent hypoxemia to late neurological handicap in mice with hyperoxia-induced lung injury." *Neonatology* **92**(1): 50-58.

Reiss, I., E. Landmann, M. Heckmann, B. Misselwitz and L. Gortner (2003). "Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age." *Arch Gynecol Obstet* **269**(1): 40-44.

Remy, B., G. Deby-Dupont and M. Lamy (1999). "Red blood cell substitutes: fluorocarbon emulsions and haemoglobin solutions." *Br Med Bull* **55**(1): 277-298.

Resch, B., S. Kurath-Koller, M. Eibisberger and W. Zenz (2016). "Prematurity and the burden of influenza and respiratory syncytial virus disease." *World J Pediatr* **12**(1): 8-18.

Rettig, J. S., C. D. Smallwood, B. K. Walsh, P. C. Rimensberger, T. E. Bachman, C. W. Bollen, E. L. Duval, F. Gebistorf, D. G. Markhorst, M. Tinnevelt, M. Todd, D. Zurakowski and J. H. Arnold (2015). "High-Frequency Oscillatory Ventilation in Pediatric Acute Lung Injury: A Multicenter International Experience." *Crit Care Med* **43**(12): 2660-2667.

Reuter, S., C. Moser and M. Baack (2014). "Respiratory distress in the newborn." *Pediatrics in review* **35**(10): 417-429.

Reynolds, P., S. Leontiadi, T. Lawson, T. Otunla, O. Ejiwumi and N. Holland (2016). "Stabilisation of premature infants in the delivery room with nasal high flow." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **101**(4): F284-287.

Rhee, C. J., C. S. da Costa, T. Austin, K. M. Brady, M. Czosnyka and J. K. Lee (2018). "Neonatal cerebrovascular autoregulation." *Pediatric research* **84**(5): 602-610.

Riedel, T., M. Kyburz, P. Latzin, C. Thamrin and U. Frey (2009). "Regional and overall ventilation inhomogeneities in preterm and term-born infants." *Intensive care medicine* **35**(1): 144-151.

Rieger-Fackeldey, E., R. Sindelar, A. Jonzon, A. Schulze and G. Sedin (2005). "Inhibition of breathing after surfactant depletion is achieved at a higher arterial PCO₂ during ventilation with liquid than with gas." *Respir Res* **6**: 24.

Riess, J. G. (2005). "Understanding the Fundamentals of Perfluorocarbons and Perfluorocarbon Emulsions Relevant to In Vivo Oxygen Delivery." *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **33**(1): 47-63.

Robbins, M., J. Trittman, E. Martin, K. M. Reber, L. Nelin and E. Shepherd (2015). "Early extubation attempts reduce length of stay in extremely preterm infants even if re-intubation is necessary." *J Neonatal Perinatal Med* **8**(2): 91-97.

Robert, R. (2007). Modélisation numérique et stratégies de commande du débit expiratoire pour éviter le collapsus des voies respiratoires en ventilation liquidienne totale. Doctorat Université de Sherbrooke

Roberts, D., J. Brown, N. Medley and S. R. Dalziel (2017). "Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth." *Cochrane Database Syst Rev* **3**: Cd004454.

Rotta, A. T. and D. M. Steinhorn (1998). "Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury." *Crit Care Med* **26**(10): 1707-1715.

Sage, M., M. Nadeau, C. Forand-Choiniere, J. Mousseau, J. Vandamme, C. Berger, J. S. Tremblay-Roy, R. Tissier, P. Micheau and E. Fortin-Pellerin (2018). "Assessing the impacts of total liquid ventilation on left ventricular diastolic function in a model of neonatal respiratory distress syndrome." **13**(1): e0191885.

Sage, M., M. Nadeau, M. Kohlhauer, J. P. Praud, R. Tissier, R. Robert, H. Walti and P. Micheau (2016). "Effect of ultra-fast mild hypothermia using total liquid ventilation on hemodynamics and respiratory mechanics." *Journal of Cryobiology*.

Sage, M., S. Stowe, A. Adler, C. Forand-Choiniere, M. Nadeau, C. Berger, S. Marouan, P. Micheau, R. Tissier, J. P. Praud and E. Fortin-Pellerin (2018). "Perflubron Distribution During Transition From Gas to Total Liquid Ventilation." *Front Physiol* **9**: 1723.

Salinas, P., E. Lopez-de-Sa, L. Pena-Conde, A. Viana-Tejedor, J. R. Rey-Blas, E. Armada and J. L. Lopez-Sendon (2015). "Electrocardiographic changes during induced therapeutic hypothermia in comatose survivors after cardiac arrest." *World journal of cardiology* **7**(7): 423-430.

Saugstad, O. D. (2006). "Oxygen and retinopathy of prematurity." *J Perinatol* **26 Suppl 1**: S46-50; discussion S63-44.

Schittny, J. C. (2017). "Development of the lung." *Cell and tissue research* **367**(3): 427-444.

Schmidt, B., R. S. Roberts, P. Davis, L. W. Doyle, K. J. Barrington, A. Ohlsson, A. Solimano and W. Tin (2006). "Caffeine therapy for apnea of prematurity." *N Engl J Med* **354**(20): 2112-2121.

Schmidt, B., R. S. Roberts, P. Davis, L. W. Doyle, K. J. Barrington, A. Ohlsson, A. Solimano and W. Tin (2007). "Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity." *N Engl J Med* **357**(19): 1893-1902.

Schmolzer, G. M., M. Kumar, G. Pichler, K. Aziz, M. O'Reilly and P. Y. Cheung (2013). "Non-invasive versus invasive respiratory support in preterm infants at birth: systematic review and meta-analysis." *Bmj* **347**: f5980.

Seger, N. and R. Soll (2009). "Animal derived surfactant extract for treatment of respiratory distress syndrome." *Cochrane Database Syst Rev*(2): Cd007836.

Shaffer, M. L., O. Baud, T. Lacaze-Masmonteil, O. M. Peltoniemi, F. Bonsante and K. L. Watterberg (2019). "Effect of Prophylaxis for Early Adrenal Insufficiency Using Low-Dose Hydrocortisone in Very Preterm Infants: An Individual Patient Data Meta-Analysis." *J Pediatr* **207**: 136-142.e135.

Shaffer, T. H., V. K. Bhutani, M. R. Wolfson, R. B. Penn and N. N. Tran (1989). "In vivo mechanical properties of the developing airway." *Pediatr Res* **25**(2): 143-146.

Shaffer, T. H., P. R. Douglas, C. A. Lowe and V. K. Bhutani (1983). "The effects of liquid ventilation on cardiopulmonary function in preterm lambs." *Pediatr Res* **17**(4): 303-306.

Shaffer, T. H. and G. D. Moskowitz (1974). "Demand-controlled liquid ventilation of the lungs." *J Appl Physiol* **36**(2): 208-213.

Shashikant, B. N., T. L. Miller, M. J. Jeng, J. Davis, T. H. Shaffer and M. R. Wolfson (2005). "Differential impact of perfluorochemical physical properties on the physiologic, histologic, and inflammatory profile in acute lung injury." *Crit Care Med* **33**(5): 1096-1103.

Shaw, G. M. and H. M. O'Brodovich (2013). "Progress in understanding the genetics of bronchopulmonary dysplasia." *Semin Perinatol* **37**(2): 85-93.

Shi, Y., H. Muniraman, M. Biniwale and R. Ramanathan (2020). "A Review on Non-invasive Respiratory Support for Management of Respiratory Distress in Extremely Preterm Infants." *Frontiers in pediatrics* **8**: 270-270.

Short, E. J., N. K. Klein, B. A. Lewis, S. Fulton, S. Eisengart, C. Kerckmar, J. Baley and L. T. Singer (2003). "Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes." *Pediatrics* **112**(5): e359.

Smith, T. M., D. M. Steinhorn, K. Thusu, B. P. Fuhrman and P. Dandona (1995). "A liquid perfluorochemical decreases the in vitro production of reactive oxygen species by alveolar macrophages." *Crit Care Med* **23**(9): 1533-1539.

Smith, V. C., J. A. Zupancic, M. C. McCormick, L. A. Croen, J. Greene, G. J. Escobar and D. K. Richardson (2004). "Rehospitalization in the first year of life among infants with bronchopulmonary dysplasia." *J Pediatr* **144**(6): 799-803.

Society, C. P. (2002). "Postnatal corticosteroids to treat or prevent chronic lung disease in preterm infants." *Pediatrics* **109**(2): 330-338.

- Spahn, D. R. (1999). "Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions." *Crit Care* **3**(5): R93-97.
- Stavis, R. L., C. A. Cox, M. R. Wolfson, A. B. Cullen, R. Roache, S. Hipp and T. H. Shaffer (1998). "Tidal Liquid Ventilation (TLV) Transition to Spontaneous Breathing(SB): 24 Hour Follow-up of Physiologic and Radiographic Correlates 1748." *Pediatr Res* **43**(S4): 298-298.
- Stein, R. T., L. J. Bont, H. Zar, F. P. Polack, C. Park, A. Claxton, G. Borok, Y. Butylkova and C. Wegzyn (2017). "Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis." *Pediatr Pulmonol* **52**(4): 556-569.
- Steurer, M. A., H. Nawaytou, E. Guslits, E. Colglazier, D. Teitel, J. R. Fineman and R. L. Keller (2019). "Mortality in infants with bronchopulmonary dysplasia: Data from cardiac catheterization." *Pediatr Pulmonol* **54**(6): 804-813.
- Stoll, B. J., N. I. Hansen, E. F. Bell, M. C. Walsh, W. A. Carlo, S. Shankaran, A. R. Laptook, P. J. Sanchez, K. P. Van Meurs, M. Wyckoff, A. Das, E. C. Hale, M. B. Ball, N. S. Newman, K. Schibler, B. B. Poindexter, K. A. Kennedy, C. M. Cotten, K. L. Watterberg, C. T. D'Angio, S. B. DeMauro, W. E. Truog, U. Devaskar and R. D. Higgins (2015). "Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012." *Jama* **314**(10): 1039-1051.
- Strueby, L. and B. Thebaud (2018). "Novel therapeutics for bronchopulmonary dysplasia." *Curr Opin Pediatr*.
- Surico, D., V. Bordino, V. Cantaluppi, D. Mary, S. Gentili, A. Oldani, S. Farruggio, C. Melluzza, G. Raina and E. Grossini (2019). "Preeclampsia and intrauterine growth restriction: Role of human umbilical cord mesenchymal stem cells-trophoblast cross-talk." *PloS one* **14**(6): e0218437-e0218437.
- Tapia-Rombo, C. A. and A. L. Hernández-Gutiérrez (2012). "[Associated factors to extubation failure of neonates and infants with bronchopulmonary dysplasia]." *Rev Invest Clin* **64**(3): 262-274.

Thébaud, B. and S. H. Abman (2007). "Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease." *Am J Respir Crit Care Med* **175**(10): 978-985.

Thomassen, M. J., L. T. Buhrow and H. P. Wiedemann (1997). "Perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages." *Crit Care Med* **25**(12): 2045-2047.

Timmermans, K., S. E. van der Wal, M. Vaneker, J. A. van der Laak, M. G. Netea, P. Pickkers, G. J. Scheffer, L. A. Joosten and M. Kox (2013). "IL-1 β processing in mechanical ventilation-induced inflammation is dependent on neutrophil factors rather than caspase-1." *Intensive care medicine experimental* **1**(1): 27-27.

Tissier, R., N. Couvreur, B. Ghaleh, P. Bruneval, F. Lidouren, D. Morin, R. Zini, A. Bize, M. Chenoune, M. F. Belair, C. Mandet, M. Douheret, J. L. Dubois-Rande, J. C. Parker, M. V. Cohen, J. M. Downey and A. Berdeaux (2009). "Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction." *Cardiovasc Res* **83**(2): 345-353.

Tissier, R., K. Hamanaka, A. Kuno, J. C. Parker, M. V. Cohen and J. M. Downey (2007). "Total liquid ventilation provides ultra-fast cardioprotective cooling." *J Am Coll Cardiol* **49**.

Tooley, R., R. B. Hirschl, A. Parent and R. H. Bartlett (1996). "Total liquid ventilation with perfluorocarbons increases pulmonary end-expiratory volume and compliance in the setting of lung atelectasis." *Crit Care Med* **24**(2): 268-273.

Townsi, N., I. A. Laing, G. L. Hall and S. J. Simpson (2018). "The impact of respiratory viruses on lung health after preterm birth." *Eur Clin Respir J* **5**(1): 1487214.

Tracy, M. K. and S. K. Berkelhamer (2019). "Bronchopulmonary Dysplasia and Pulmonary Outcomes of Prematurity." *Pediatr Ann* **48**(4): e148-e153.

Tsagogiorgas, C., M. Alb, P. Herrmann, M. Quintel and J. P. Meinhardt (2011). "Cardiopulmonary function and oxygen delivery during total liquid ventilation." *Pediatr Pulmonol* **46**(10): 964-975.

Tyson, J. E., L. L. Wright, W. Oh, K. A. Kennedy, L. Mele, R. A. Ehrenkranz, B. J. Stoll, J. A. Lemons, D. K. Stevenson, C. R. Bauer, S. B. Korones and A. A. Fanaroff (1999). "Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network." *N Engl J Med* **340**(25): 1962-1968.

van Haaften, T., R. Byrne, S. Bonnet, G. Y. Rochefort, J. Akabutu, M. Bouchentouf, G. J. Rey-Parra, J. Galipeau, A. Haromy, F. Eaton, M. Chen, K. Hashimoto, D. Abley, G. Korbitt, S. L. Archer and B. Thebaud (2009). "Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats." *Am J Respir Crit Care Med* **180**(11): 1131-1142.

Vaporidi, K., G. Voloudakis, G. Priniannakis, E. Kondili, A. Koutsopoulos, C. Tsatsanis and D. Georgopoulos (2008). "Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury at a constant PaCO₂ in a mouse model of normal lung." *Crit Care Med* **36**(4): 1277-1283.

Velvis, H. and H. S. Klopfenstein (1995). "Filling characteristics of left ventricle in newborn lambs." *Am J Physiol* **269**(6 Pt 2): H2039-2043.

Venkataraman, R., M. Kamaluddeen, S. U. Hasan, H. L. Robertson and A. Lodha (2017). "Intratracheal Administration of Budesonide-Surfactant in Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia in Very Low Birth Weight Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Pediatr Pulmonol* **52**(7): 968-975.

Vitali, S. H. and J. H. Arnold (2005). "Bench-to-bedside review: Ventilator strategies to reduce lung injury -- lessons from pediatric and neonatal intensive care." *Critical care (London, England)* **9**(2): 177-183.

Vom Hove, M., F. Prenzel, H. H. Uhlig and E. Robel-Tillig (2014). "Pulmonary outcome in former preterm, very low birth weight children with bronchopulmonary dysplasia: a case-control follow-up at school age." *J Pediatr* **164**(1): 40-45.e44.

Vrancken, S. L., W. P. de Boode, J. C. Hopman, M. G. Looijen-Salamon, K. D. Liem and A. F. van Heijst (2012). "Influence of lung injury on cardiac output measurement using

transpulmonary ultrasound dilution: a validation study in neonatal lambs." *Br J Anaesth* **109**(6): 870-878.

Wang, H. M., M. Bodenstein and K. Markstaller (2008). "Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury." *Eur Surg Res* **40**(4): 305-316.

Ware, L. B. and M. A. Matthay (2000). "The acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* **342**(18): 1334-1349.

Weers, J. (1993). "A physicochemical evaluation of perfluorochemicals for oxygen transport applications." *J Fluorine Chem* **64**.

Wheeler, K. I., P. G. Davis, C. O. Kamlin and C. J. Morley (2009). "Assist control volume guarantee ventilation during surfactant administration." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **94**(5): F336-338.

Whitsett, J. A., S. E. Wert and T. E. Weaver (2015). "Diseases of pulmonary surfactant homeostasis." *Annu Rev Pathol* **10**: 371-393.

Wolfson, M. R., J. S. Greenspan and T. H. Shaffer (1996). "Pulmonary administration of vasoactive substances by perfluorochemical ventilation." *Pediatrics* **97**(4): 449-455.

Wolfson, M. R., R. B. Hirschl, J. C. Jackson, F. Gauvin, D. S. Foley, W. J. Lamm, J. Gaughan and T. H. Shaffer (2008). "Multicenter comparative study of conventional mechanical gas ventilation to tidal liquid ventilation in oleic acid injured sheep." *Asaio j* **54**(3): 256-269.

Wolfson, M. R. and T. H. Shaffer (2004). "Liquid ventilation: an adjunct for respiratory management." *Paediatr Anaesth* **14**(1): 15-23.

Wolfson, M. R. and T. H. Shaffer (2005). "Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: ventilation and beyond." *Paediatr Respir Rev* **6**(2): 117-127.

Wolfson, M. R. and T. H. Shaffer (2005). "Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: ventilation and beyond." *Paediatr Respir Rev* **6**(2): 117-127.

Wolfson, M. R., R. G. Stern, N. Kechner, K. M. Sekins and T. H. Shaffer (1994). "Utility of a perfluorochemical liquid for pulmonary diagnostic imaging." *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **22**(4): 1409-1420.

Wong, J. J.-M., S. Liu, H. Dang, N. Anantasit, P. H. Phan, S. Phumeetham, S. Qian, J. S. M. Ong, C. S. Gan, Y. K. Chor, R. Samransamruajkit, T. F. Loh, M. Feng, J. H. Lee, A. Pediatric and N. Critical care Medicine Asian (2020). "The impact of high frequency oscillatory ventilation on mortality in paediatric acute respiratory distress syndrome." *Critical care (London, England)* **24**(1): 31-31.

Woodring, J. H. and J. C. Reed (1996). "Types and mechanisms of pulmonary atelectasis." *J Thorac Imaging* **11**(2): 92-108.

Woods, C. M., G. Neslund, E. Kornbrust and S. F. Flaim (2000). "Perflubron attenuates neutrophil adhesion to activated endothelial cells in vitro." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**(5): L1008-1017.

Yeh, T. F., C. M. Chen, S. Y. Wu, Z. Husan, T. C. Li, W. S. Hsieh, C. H. Tsai and H. C. Lin (2016). "Intratracheal Administration of Budesonide/Surfactant to Prevent Bronchopulmonary Dysplasia." *Am J Respir Crit Care Med* **193**(1): 86-95.

Younge, N., R. F. Goldstein, C. M. Bann, S. R. Hintz, R. M. Patel, P. B. Smith, E. F. Bell, M. A. Rysavy, A. F. Duncan, B. R. Vohr, A. Das, R. N. Goldberg, R. D. Higgins and C. M. Cotten (2017). "Survival and Neurodevelopmental Outcomes among Periviable Infants." *N Engl J Med* **376**(7): 617-628.

Zhao, J. and Y. Zhao (2015). "Interleukin-33 and its Receptor in Pulmonary Inflammatory Diseases." *Critical reviews in immunology* **35**(6): 451-461.

Zhu, Y. B., D. H. Liu, Y. B. Zhang, A. J. Liu, X. M. Fan, C. H. Qiao, Q. Wang and Y. L. Liu (2013). "Total liquid ventilation reduces oleic acid-induced lung injury in piglets." *Chin Med J (Engl)* **126**(22): 4282-4288.

Zhu, Y. B., Q. Wang, Y. L. Liu, X. F. Li, J. A. Li, X. D. Lü, F. Ling, A. J. Liu and X. M. Fan (2010). "Effect of partial liquid ventilation on oleic acid-induced inflammatory responses in piglets." *Chin Med J (Engl)* **123**(15): 2088-2093.

Zignego, J. C., D. M. Tang, C. P. Richardson and T. N. Hansen (2010). "337 High-Speed Video Analysis of Highamplitude Bubble-Continuous Positive Airway Pressure Demonstrates That "Water Hammer" Effects Cause Large Oscillations in Airway Pressure." *Pediatric Research* **68**(1): 173-173.

ANNEXE 1.

Tableau supplémentaire 1. Séquences d'ADN des amorces utilisées pour les dosages des ARNm par RT-qPCR dans l'article 3

Forward Name	Reverse Name	Forward Sequence	Reverse Sequence
GAPDH.qoa.F1	GAPDH.qoa.R1	TGGTGAAGGTCGGAGTGAACGG	TGAAGGGGTCATTGATGGCAACG
RPL13A.qoa.F2	RPL13A.qoa.R2	AAGGGATAAGAAACCTGCGTCTAGG	CGGCCATCGAGCACCAGGAC
TBP.qoa.F2	TBP.qoa.R2	AGACCATTGCACTTCGTGCC	TGCACACCATCTTCCAGAGCT
AGER.qoa.F1	AGER.qoa.R1	TGCCAGTGGAGGAAGTCCAGT	GGGCCTGCCATCCTTGATCC
CSF2.qoa.F1	CSF2.qoa.R1	TCGTCTCTGAAATGTTGACTCCAG	GGGGCAGTGTTCCTGTAGTGGC
CXCL1.qoa.F4	CXCL1.qoa.R4	TGCGGCCAAACCGAAGTCAT	TGGAGCTGGCCTGTTTAGCAT
ICAM1.qoa.F2	ICAM1.qoa.R2	TCCTGCTCGGACTCTGCTG	AGGCCAAACGTTGTCTTCGGT
IL1A.qoa.F1	IL1A.qoa.R2	TGCTCAAATGAAGACGAACCCGT	GGCAATGAACAACCTTGGATGGGC
IL1B.qoa.F1	IL1B.qoa.R1	GCTCTCCACCTCCTCTCACAGG	TCCCTGATACCCAAGGCCACAG
IL1R1.qoa.F2	IL1R1.qoa.R2	TCGCACGGCTTAATATTCGGCA	TGTGGGCTTCTGGAATCAGGGA
IL33.qoa.F1	IL33.qoa.R1	TGGTGATGGTGGTCATCGGAAGT	AAGGCTTGTTCTGGCAACTGGT
IL6.qoa.F1	IL6.qoa.R1	TCCTCCAGAACGAGTTTGAGGGA	CAGCATGTCAAGTGTGTGGCT
CCL4.LOC101114285.qoa.F2	CCL4.LOC101114285.qoa.R2	GCTGCTTCTTTACACCCTGCG	CCTGCCTGCCCTTTTGGTCTG
NFKB1.qoa.F1	NFKB1.qoa.R1	CTGAGTCCCCTCCCTCCAAA	TCCGTGTAGCCCATCTGTCTCA
NFKB2.qoa.F1	NFKB2.qoa.R1	GGTGGTGGGAGAGGTGTCGC	AGGTCGTCTCTCGCTGGCC
TNF.qoa.F2	TNF.qoa.R2	TAACAAGCCGGTAGCCACGTT	TTGTCTTTCAGCTCCACGCCG
TNFRSF1A.qoa.F2	TNFRSF1A.qoa.R2	ACCGTGCCTCCTGCTGCT	GCAAATGGTGCTATTTGCGGGT
CXCL8.qoa.F1	CXCL8.qoa.R1	GCTGGCTGTTGCTCTCTTGGC	GGGGTGAAAGGTGTGGAATGT

ANNEXE 2.

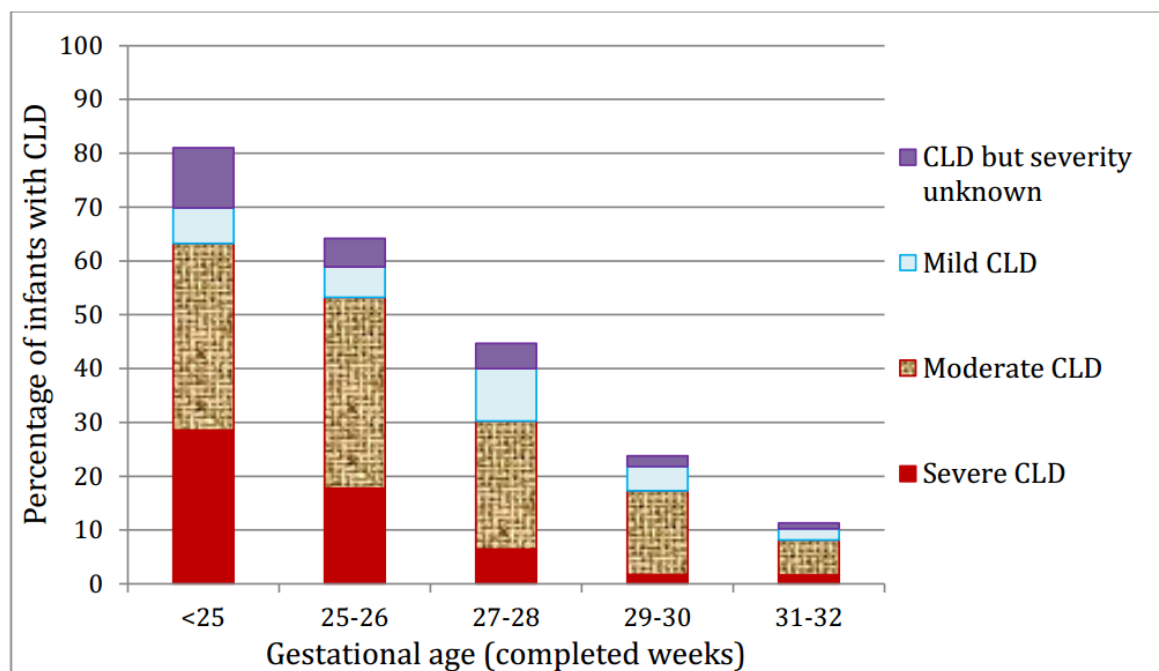


Figure supplémentaire 1 : Pourcentage de dysplasie bronchopulmonaire à 36 semaines d'âge post-menstruel ou lors du congé d'hôpital (figure tirée du rapport annuel du réseau néonatal canadien, 2018).